

Aus dem Medizinischen Zentrum für

Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Untersuchungen zur Expression und subzellulären Lokalisation der  
v-SNARE Isoformen VAMP-1a und -1b**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Fiona Rosali Rodepeter**

aus Siegen

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
29.04.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. S. Wiegand

1. Korreferent: Prof. Dr. R. Jacob



**Für meine Eltern und Robert in Liebe und Dankbarkeit**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Membranfusion und synaptische Transmission	1
1.2 Die SNARE-Hypothese	3
1.3 VAMP ( <i>vesicle associated membrane protein</i> )	6
1.3.1 Struktur	6
1.3.2 Genomische Organisation und evolutionäre Konservierung	7
1.3.3 Verteilung und Vorkommen von VAMP-1	8
1.3.4 VAMP-Homologe in niederen Eukaryoten	8
1.4 Alternatives Spleißen	9
1.4.1 Mechanismus und Bedeutung des alternativen Spleißens	9
1.4.2 Spleiß-Isoformen von VAMP-1	10
1.5 Zielsetzung	12
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Material	13
2.1.1 Reagenzien und Fertig-Kits	13
2.1.2 Geräte	16
2.1.3 Lösungen und Puffer	19
2.1.4 Antikörper	22
2.1.5 Standards und Probenpuffer	23
2.1.6 Oligonukleotide ( <i>Primer</i> ) für die PCR	24
2.1.7 Plasmide für die Klonierungen	25
2.1.8 Enzyme für den Restriktionsverdau	25
2.1.9 Zelllinien	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Klonierung der VAMP-1 Spleiß-Varianten in Fluoreszenzvektoren	26
2.2.2 Expression der VAMP-1 Konstrukte in Säugetier-Zelllinien	27
2.2.3 Polymerasekettenreaktion	29

2.2.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	30
2.2.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	32
2.2.6	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	32
2.2.7	Ligation.....	32
2.2.8	Transformation und Anzucht kompetenter Bakterien.....	33
2.2.9	Plattierung und Picken von Kolonien.....	33
2.2.10	Plasmid-Isolierung aus Bakterien.....	34
2.2.11	Screening und Sequenzierung.....	35
2.2.12	Zellkultur und Arbeit mit Zelllinien.....	36
2.2.13	Transfektion von Zelllinien.....	37
2.2.14	Immunzytochemie.....	38
2.2.15	Fluoreszenzmikroskopie.....	39
2.2.16	Proteinextraktion.....	42
2.2.17	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42
2.2.18	Messung der DNA-Konzentration.....	44
2.2.19	Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	44
2.2.20	Western Blot-Analyse.....	45
2.2.21	Nachweis von Proteinbanden mittels Chemilumineszenz.....	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1	Validierung der Expression von GFP- und RFP-VAMP-1a und -1b Konstrukten..	48
3.2	Hinweise auf mögliche Unterschiede in der subzellulären Lokalisation beider VAMP-1 Isoformen.....	50
3.2.1	Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1a.....	50
3.2.2	Kotransfektion von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1b.....	50
3.2.3	Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1b.....	53
3.2.4	Kotransfektion von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1a.....	53
3.3	Beobachtung von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1b exprimierenden Vesikeln mittels TIRF-Mikroskopie.....	56
3.3.1	Intrazelluläre Vesikel zeigen variable Bewegungsmuster.....	56

3.3.2	Hinweise auf Vesikelkontakte GFP-Vamp-1a und RFP-VAMP-1b exprimierender Vesikel ohne und mit anschließender Fusion.....	56
3.4	Untersuchungen zur Kolokalisation von VAMP-1a und VAMP-1b mit Markerproteinen verschiedener Zellkompartimente.....	62
3.4.1	VAMP-1a und -1b zeigen keine Sortierung zu Mitochondrien.....	62
3.4.2	VAMP-1a und -1b sortieren nicht zu Peroxisomen.....	62
3.4.3	Hinweise auf eine Expression von VAMP-1a und VAMP-1b in vereinzeltten Bereichen früher Endosomen .....	67
3.4.4	Hinweise auf eine potentielle Kolokalisation von VAMP-1a und VAMP-1b mit Lysosomen.....	67
3.4.5	Untersuchungen zur möglichen Lokalisation von VAMP-1a und VAMP-1b in Autophagosomen.....	72
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1	Der C-Terminus als Sortierungssignal in VAMPs und anderen SNARE-Proteinen.....	75
4.2	Mögliche Bedeutung von VAMP-1 und seinen Spleiß-Isoformen bei pathologischen Zuständen.....	77
4.3	Ähnlichkeit der C-terminalen Sequenz von VAMP-1b mit dem Sortierungssignal peroxisomaler Proteine.....	79
4.4	VAMP und Endozytose.....	80
4.5	Hinweise auf homotypische Fusion.....	85
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>90</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>117</b>
8.1	Ergänzende Abbildung.....	117
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	118
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	120
8.4	Tabellarischer Lebenslauf.....	122
8.5	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	123
8.6	Danksagung.....	124
8.7	Ehrenwörtliche Erklärung.....	126

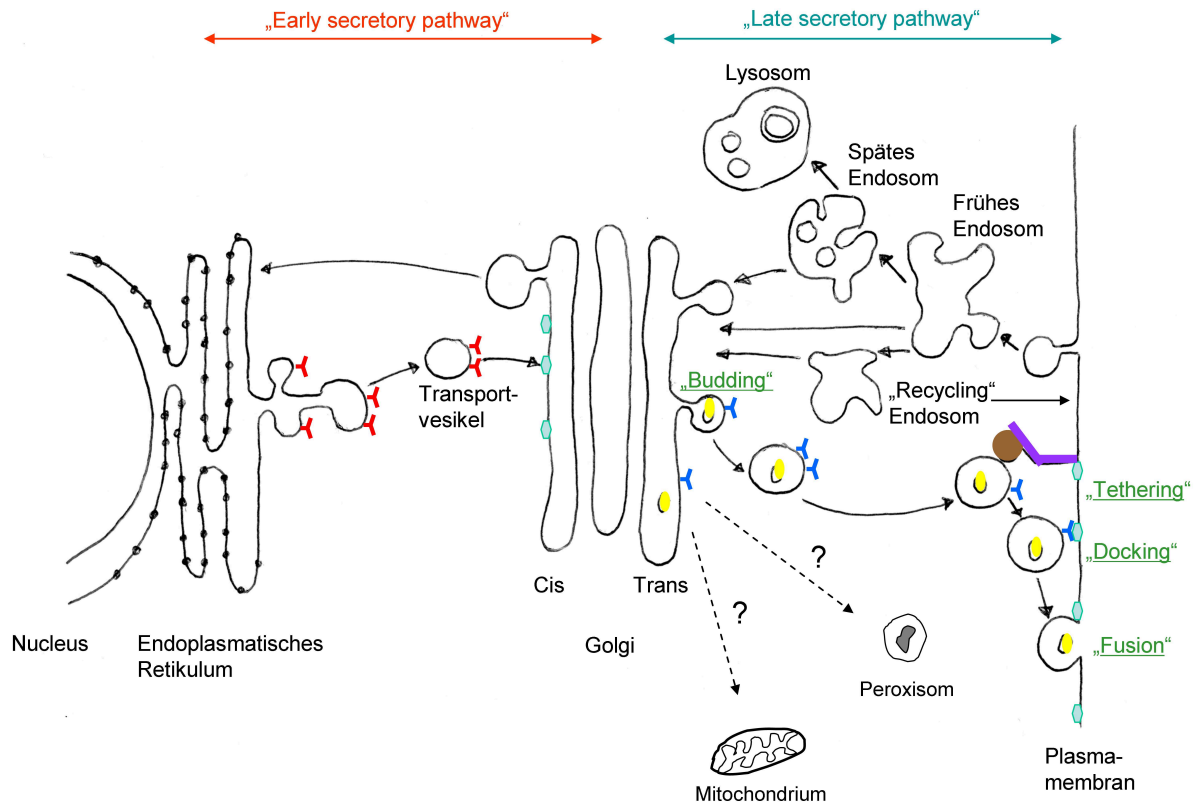
## 1. Einleitung

### 1.1 Membranfusion und synaptische Transmission

Der Mechanismus des intrazellulären Vesikeltransportes stellt einen zentralen Aspekt in der gesamten Zellbiologie dar. Das Interesse vieler Forschergruppen besteht in der Frage, wie der genaue Mechanismus der Verschmelzung von Vesikeln mit ihrer Zielmembran (Fusion) funktioniert und wie andererseits ein bestimmtes Vesikel seine Zielmembran identifiziert (Spezifität).

Der Mechanismus der Membranfusion ist von größter Bedeutung für die Funktion der Zelle. Durch den zielgerichteten Transport von Vesikeln werden Zellkompartimente verschiedener Funktionen untereinander funktionell verbunden, wodurch ein Fluss elementarer Bestandteile zur Erzeugung zelleigener Produkte aufrechterhalten wird (Palade, 1975). Zu diesem sogenannten Endomembran-System zählen typischerweise das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, Endosomen und Lysosomen, aber auch Mitochondrien und Peroxisomen (Bonifacio and Glick, 2004). Beispielsweise fusionieren Transportvesikel, welche das ER mit hier modifizierten Proteinen als Fracht verlassen, mit der cis-Seite des Golgi-Netzwerks, wobei die für den Export bestimmten Proteine weiter über einen Vesikel-abhängigen Transport durch die verschiedenen Abschnitte des Golgi-Apparates transportiert werden. Hier kann eine weitere Modifikation der Proteine erfolgen, bis sie den Bereich des trans-Golgi-Netzwerks (TGN) erreichen, in welchem die für den Export bestimmten Proteine Vesikeln zugeteilt werden, welche speziellen Transportrouten folgen (Abbildung 1.1). Für alle diese Vesikeltransport-abhängigen Vorgänge sind Proteine erforderlich, die eine Interaktion zwischen Vesikelmembran und der jeweiligen Ziel(organelle)membran herstellen und daraufhin eine Fusion der Phospholipid-Membranen einleiten. Die Regulation dieses Transportes ist komplex und angewiesen auf einen evolutionär teilweise hoch-konservierten Apparat von Membran-verbindenden Elementen, die arbeitsteilig eine Spezifität herstellen (Bennett and Scheller, 1993; Jahn et al., 2003). Diese Vesikelproteine sind auch für den Ablauf von präformierten Membranfusionen notwendig, die auf einen definierten Reiz hin in der Zelle stattfinden – als sogenannte regulierte Exozytose (Gerst, 1999). Auf diese Weise werden Hormone, Enzyme, Muzine oder Zytokine freigesetzt. Auf umgekehrtem Wege können aber auch Bestandteile von außerhalb der Zelle mittels der sogenannten Endozytose aufgenommen bzw. internalisiert werden, die im

Stoffwechsel (z.B. LDL-Rezeptor) oder bei der Signaltransduktion (z.B. EGF-Rezeptor) von Bedeutung sind. Von hier aus können diese später über frühe und späte Endosomen im Rahmen eines Recycling-Mechanismus wieder verwertet oder schließlich im Lysosom abgebaut werden (Luzio et al., 2000).



**Abbildung 1.1 Transportwege der Zelle und beteiligte Kompartimente des Endomembransystems, modifiziert nach Bonifacino und Glick (Bonifacino and Glick, 2004).** Stadien des Vesikeltransportes (grün): Vesikel knospen vom Donorkompartiment ab (*Budding*). Über sog. *Tethering*-Faktoren (lila) und Rab-Proteine (braun) erfolgt eine Annäherung der Vesikel an die Zielmembran des Akzeptorkompartments. Im Rahmen des sogenannten *Docking* interagieren spezifische Proteine auf der Vesikel- (rot bzw. dunkelblau) und Zielmembran (hellblau), die über ihre Transmembrandomäne fest in der jeweiligen Phospholipidmembran verankert sind, wobei es zu einem Kontakt beider Membranen kommt. Auf einen definierten Reiz hin kommt es schließlich zur Fusion beider Membranen und zur Freisetzung des Vesikelinhaltes (gelb). VAMPs (dunkelblau dargestellt) sind beteiligt an Transportprozessen zwischen trans-Golgi-Netzwerk und Plasmamembran, dem sogenannten *Late secretory pathway*.

Als eine Variante der stimulierten Exozytose kann auch die synaptische Transmission gesehen werden, welche die Grundlage für eine Kommunikation

zwischen Nervenzellen darstellt und damit einen fundamentalen Prozess in der chemischen Transmission im Nervensystem darstellt.

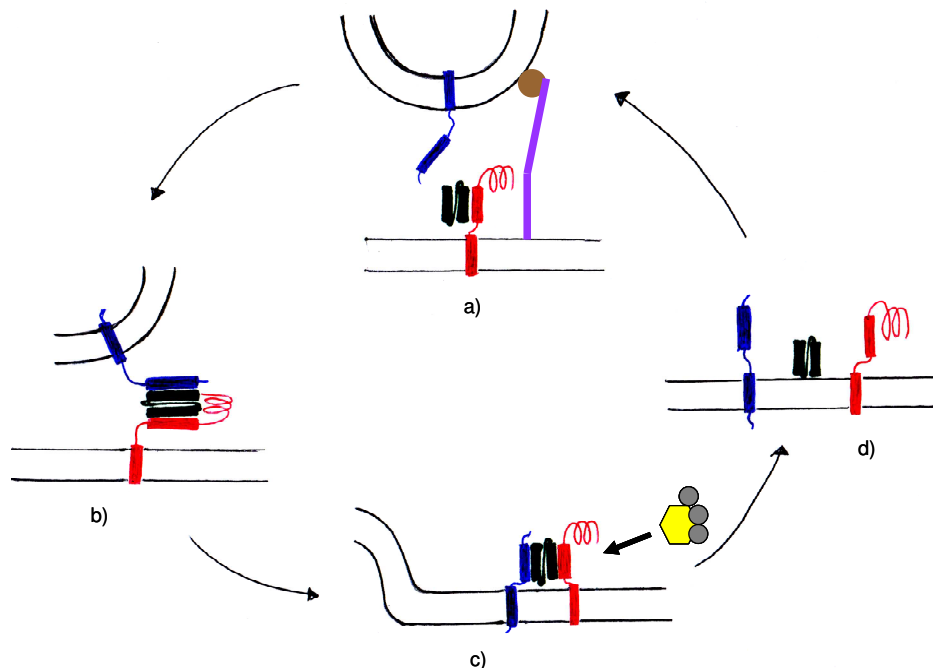
Die Synapse als Schaltstelle zwischen einzelnen Neuronen ist dabei der Ort, an dem neuronale Informationen in Form von chemischen Botenstoffen, sogenannten Transmittern, ausgetauscht werden. In Vesikeln liegen die Transmitter vor, die nach Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt abgegeben werden. Die Einheit eines synaptischen Vesikels kann elektronenmikroskopisch als Kugel mit einem Durchmesser von 50 nm sichtbar gemacht werden (Fatt and Katz, 1952; Lin and Scheller, 1997). Auf der Membranoberfläche solcher synaptischer Vesikel konnten verschiedenste Proteine identifiziert werden, deren Funktion im Ablauf des synaptischen Zyklus, das heißt für die Formierung, das Andocken und die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Zielmembran, erst nach und nach in Ansätzen aufgeklärt wurden (Bennett and Scheller, 1994; Takamori et al., 2006). Aufgrund der hohen sekretorischen Aktivität neuronaler Gewebe kann hier eine hohe Expression von für die Sekretion bzw. Vesikelfusion benötigten Proteinen, wie z.B. auch den *vesicle associated membrane proteins* (VAMPs) beobachtet werden. Obwohl zunächst in neuronalen Geweben nachgewiesen, so konnte im Folgenden gezeigt werden, dass VAMP-Proteine auch in nicht-neuronalen Geweben exprimiert sind (Braun et al., 1994), insbesondere in solchen, die über eine hohe sekretorische Aktivität verfügen, wie etwa Speicheldrüsen (z.B. Pankreas und Glandula Parotis) (Braun et al., 1994; Mandic et al., 1997; Mandic and Lowe, 1999).

## 1.2 Die SNARE-Hypothese

Für beide Vorgänge, die konstitutive Membranverschmelzung als auch die stimulierte Exozytose, scheint ein gemeinsamer Mechanismus eingesetzt zu werden, der bestimmte konservierte Proteine umfasst, mithilfe derer eine Vesikelfusion realisierbar ist. Nach der sogenannten SNARE- (*SNAP-receptor*) Hypothese besteht dieser Fusionsapparat aus einem Kern-Komplex von drei Proteinen, die jeweils auf der Vesikelmembran als Donor (v-SNARE) oder der Ziel- (*target*) Membran als Akzeptor (t-SNARE) lokalisiert sind (Abbildung 1.2). Die Elemente dieses Kern-Komplexes wurden aus Rinderhirnhomogenisat als membrangebundene Rezeptoren für die wasserlöslichen Faktoren NSF (*N-ethylmaleimid-sensitive factor*) und SNAP (*soluble NSF-attachment protein*) isoliert (Sollner et al., 1993b). Diesen Faktoren

wies man eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären Membranfusion zu, da sie im gemeinsamen Komplex zur Bindung der Golgi-Membran fähig waren.

Es konnten drei SNAREs (*SNAP-receptors*), die schon zuvor als Komponenten synaptischer Membranen identifiziert wurden, unterschieden werden: der v-SNARE VAMP-2 und die t-SNAREs SNAP-25 (Synaptosomen-assoziiertes Protein von 25 kDa) sowie Syntaxin-1, die als erste Vertreter ihrer jeweiligen Gruppe entdeckt wurden. Während der Vesikelfusion kommt es zu einer äquimolaren Zusammenlagerung dieser Proteine zum Kern-Komplex, der als zentral für die Fusion von Membranen angesehen wird (Chen and Scheller, 2001; Sollner, 2004).

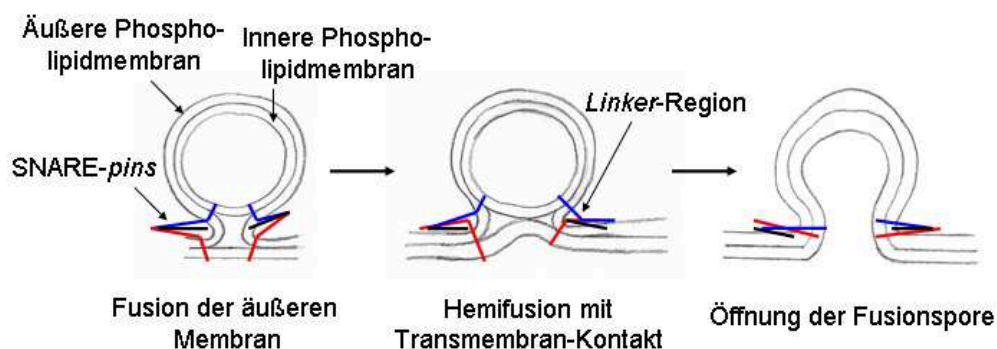


**Abbildung 1.2 Ablauf des SNARE-Zyklus, modifiziert nach Jahn und Scheller (Jahn and Scheller, 2006).** a) Durch *Tethering*-Faktoren (lila) und Rab-Proteine (braun) gefördert, kommt es zu einer Annäherung von v-SNAREs (VAMPs - blau) an den Akzeptor-Komplex der Zielmembran, welcher von t-SNAREs gebildet wird (SNAP-25 - schwarz, Syntaxins - rot). b) Die SNARE-Proteine lagern sich zum sogenannten Kern (*Core*)-Komplex in trans-Konformation zusammen. Hieran beteiligt sind vier alpha-helikale Proteinsegmente (jeweils eines von VAMP und Syntaxin, zwei von SNAP-25), die gemeinsam sogenannte SNARE-*pins* bilden. Hierdurch kommen sich Vesikel- und Zielmembran näher und können schließlich verschmelzen. c) Danach liegt der Komplex in der Zielmembran in cis-Konformation vor. Erst durch Anlagerung des Komplexes aus NSF als ATPase (gelb) und α-SNAP (grau) kann diese Konformation nach ATP-Hydrolyse aufgelöst werden. d) Die einzelnen SNARE-Partner stehen dann für eine erneute Zusammenlagerung zur Verfügung.



Durch Formation dieses besonders stabilen Komplexes kommt es zu einer Änderung der Konformation beteiligter SNAREs, wodurch die Energiebarriere zur Fusion überwunden werden kann (Antonin et al., 2002).

Hieran beteiligt sind bestimmte alpha-helikale Proteinsegmente, die sogenannte *coiled coils* bilden und bezüglich der Transmembrandomäne Amino (N) -terminal lokalisiert sind (Chapman et al., 1994). So zeichnet sich das v-SNARE VAMP-2 und die t-SNAREs SNAP25 und Syntaxin durch dieses gemeinsame hochkonservierte SNARE-Motiv aus, welches eine Länge von ca. 60-70 Aminosäuren aufweist (Bock et al., 2001). Diese gewundenen Segmente finden sich vor der Fusion in paralleler Orientierung in Vierer-Bündeln, sogenannten trans-Komplexen oder SNARE-*pins*, zusammen, und man nimmt an, dass die vom N- zum Carboxy (C) -Terminus fortschreitende Zusammenlagerung der einzelnen Ketten ähnlich eines Reißverschlussprinzips die C-Termini der SNARE-Proteine und damit die gegenüberliegenden Membranen einander annähert (Hanson et al., 1997; Lin and Scheller, 1997; Hua and Charlton, 1999; Melia et al., 2002; Pobbati et al., 2006; Malsam et al., 2008) (Abbildung 1.2). SNARE-*pins* sind in der Lage, die notwendige Energie für eine sogenannte Hemifusion der Membranen, das heißt die Fusion mit nur der äußeren Schicht der Doppel-Phospholipidmembran, als Zwischenschritt herbeizuführen (Xu et al., 2005; Reese et al., 2005; Lu et al., 2005; Malsam et al., 2008) (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3 Hemifusion von Vesikel und Plasmamembran, modifiziert nach Jahn und Scheller (Jahn and Scheller, 2006).** Bei der Hemifusion als Zwischenschritt auf dem Weg zur kompletten Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran mit Austausch seines Inhalts kommt es zunächst zu einer Verschmelzung der äußeren Phospholipidmembran mit der proximalen Plasmamembran (links). Anschließend kommt auch die innere Phospholipidschicht mit der gegenüberliegenden Membran in Kontakt (Mitte), über die starre *Linker-Region* wird Energie auf die Lipidschicht übertragen, so dass diese sich verformt und sich eine Fusionspore öffnet.

Zur Vollziehung der endgültigen Membranverschmelzung nach Hemifusion sind die Transmembrandomänen sowie das Segment zwischen SNARE-Motiv und Transmembrandomäne der beteiligten SNAREs (sogenannte *Linker-Region*) von größter Bedeutung (McNew et al., 1999; McNew et al., 2000; Grote et al., 2000; Wang et al., 2001; Han et al., 2004; Hofmann et al., 2006; Malsam et al., 2008). Danach binden drei  $\alpha$ -SNAP-Moleküle das Helix-Bündel des Komplexes und rekrutieren NSF (Rice and Brunger, 1999) zu einem 20S-Komplex (Sollner et al., 1993a). Als ATPase kann NSF ATP-Hydrolyse katalysieren, die eine Auflösung des energetisch günstigen SNARE-Komplexes zur Folge hat und die SNARE-Partner für eine erneute Reaktivierung zur Verfügung stellt (Mayer et al., 1996)

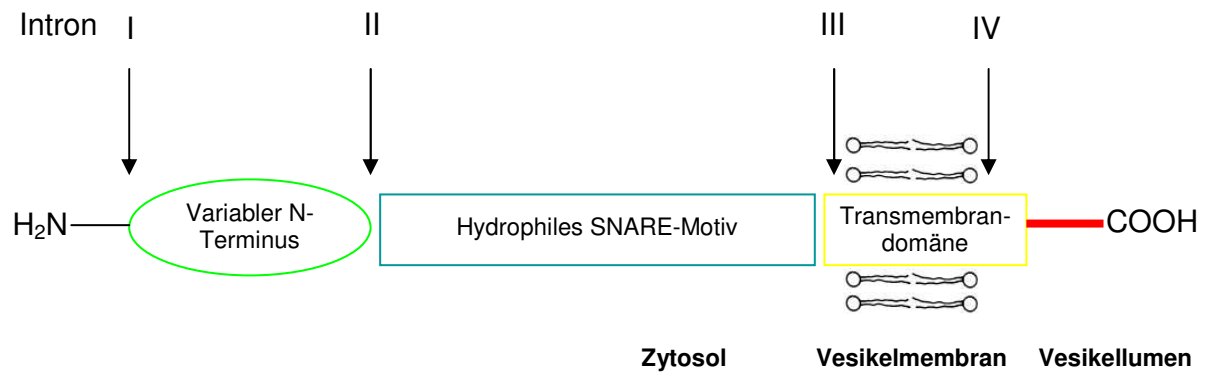
### **1.3 VAMP (*vesicle associated membrane protein*)**

#### **1.3.1 Struktur**

Die cDNA von VAMP (*vesicle associated membrane protein*) wurde 1988 von Trimble und Kollegen in cholinergen synaptischen Vesikeln des elektrischen Organs des kalifornischen Zitterrochens *Torpedo californica* nachgewiesen (Trimble et al., 1988). Schon zu diesem Zeitpunkt wies die resultierende Proteinstruktur auf die mögliche Funktion des Proteins als Bestandteil der synaptischen Vesikelmembran hin. Davon unabhängig entdeckten 1989 Baumert und Kollegen im Rattenhirn das mit den VAMP-Proteinen identische Protein Synaptobrevin, welches aus kleinen synaptischen Vesikeln mit verschiedensten Neurotransmittern isoliert wurde und zusammen mit dem bereits bekannten Synaptophysin in Nervenendigungen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert war (Baumert et al., 1989).

Bei den VAMPs handelt es sich um eine Familie von kleinen Membranproteinen von ca. 120 Aminosäuren Länge. Strukturell können drei Domänen unterschieden werden (Trimble, 1993): Der N-Terminus besteht aus 25-35 Aminosäuren (28 bei VAMP-1), die sich durch einen Reichtum an Prolin-Resten auszeichnen (McCaffery and DeGennaro, 1986; Sudhof et al., 1987; Leube et al., 1987; Trimble et al., 1988). Darauf folgen entweder eine längere oder zwei kurze amphipathische, alpha-helikale Segmente, die aufgrund vieler geladener Aminosäuren *coiled coil*-Strukturen bilden können. Diese polare Domäne wird gefolgt von einem Segment mit maximalem Hydrophobizitätsindex nach Kyte und Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982), das C-terminal die Membran durchspannt und als Anker dient (Abbildung 1.4). Verdauanalysen von lysierten und intakten Vesikeln mithilfe zytosolisch arbeitender

Enzyme konnten zeigen, dass der N-terminale Rest von VAMP im zytosolischen Bereich der Zelle lokalisiert ist (Elferink et al., 1989) und es sich bei dem C-terminalen hydrophoben Segment um eine echte Transmembrandomäne handelt (Sudhof et al., 1989).



**Abbildung 1.4 Schema zum Aufbau von VAMP (Synaptobrevin) aus drei verschiedenen funktionellen Domänen, modifiziert nach Trimble und Kollegen (Trimble et al., 1988).** Mit I-IV sind die Bereiche dazwischen liegender Introns der entsprechenden prä-mRNA bezeichnet. Der N-Terminus liegt zytosolisch, der C-Terminus intravesikulär. Der fett in rot dargestellte Anteil des Proteins entspricht dem intraluminalen Bereich, der in den verschiedenen bekannten VAMP-1 Isoformen drei bis siebzehn Aminosäuren umfasst und dessen Bedeutung nur unzureichend geklärt ist.

Einen weiteren Hinweis für die Funktion von VAMPs bei der Vesikelexozytose konnte die Entdeckung liefern, dass diese spezifische Schnittstellen für die aus Clostridien isolierten Neurotoxine Botulinum- und Tetanustoxin aufweisen (Schiavo et al., 1992; Schiavo et al., 1993).

Die Wirkung dieser Toxine beruht auf der Spaltung der an der Exozytose beteiligten SNARE-Proteine, die schließlich zu einer Hemmung der Vesikelfusion mit der präsynaptischen Plasmamembran und damit zur Hemmung der Informationsübertragung speziell an der motorischen Endplatte führt mit der Folge von muskulären Lähmungen.

### 1.3.2 Genomische Organisation und evolutionäre Konservierung

Anhand von Vergleichen mittels cDNA-Datenbanken wurden zunächst zwei VAMP-Isoformen 1 und 2 im Zentralnervensystem identifiziert, die genetisch zueinander eine Homologie von 77% aufweisen und im extremen N-Terminus variieren. Die

Gene beider Isoformen weisen fünf Exons auf. Diese Exons entsprechen weitestgehend den funktionellen Domänen des Genproduktes, wobei die am höchsten konservierte Aminosäuresequenz der Proteine die polare hydrophile Sequenz im mittleren Bereich des Proteins ist (Elferink et al., 1989;Archer et al., 1990). Gerade diese mittlere Sequenz entspricht dem Bereich zwischen Zytosol und Vesikelmembran, der bei der Ausbildung des SNARE-Komplexes eine wesentliche Rolle spielt. Bei der Betrachtung der N- sowie C-terminalen Abschnitte fällt hingegen eine hohe Variabilität auf, was weitere spezifische Funktionen dieser Proteinbereiche vermuten lässt (Archer et al., 1990).

### **1.3.3 Verteilung und Vorkommen von VAMP-1**

Bei VAMP-2 handelt es sich um die im Rattenhirn am stärksten exprimierte Form, während VAMP-1 eine geringere Expression aufweist und vor allem im Rückenmark nachweisbar ist (Elferink et al., 1989). Hier ist VAMP-1 in erster Linie im Zusammenhang mit motorischen Funktionen exprimiert und konnte beispielsweise in Vorderhörnern und somatomotorischen Kernen der Hirnnerven sowie dem Nucleus ruber nachgewiesen werden. VAMP-2 findet sich dagegen in autonomen Neuronen, sensorischen und integrativen Zentren. Die lokalen Unterschiede weisen auf eine spezialisierte Funktion der beiden Isoformen in verschiedenen Neuronentypen hin (Trimble et al., 1990).

Auch außerhalb des Nervensystems ist diese differentielle Verteilung in verschiedenen Zelltypen der entsprechenden Gewebe aufrechterhalten. So findet sich in der Nebenniere VAMP-2 vor allem in corticalen, VAMP-1 dagegen in medullären Anteilen (Rossetto et al., 1996). Im Hals-Nasen-Ohren-Bereich lässt sich diese Zelltyp-abhängige Expression der Isoformen in der Glandula Parotis wiederfinden, wo VAMP-1 in Nervenendigungen, welche die Azini innervieren, nachweisbar war, nicht jedoch in Zymogengranula der Azinuszellen (Gaisano et al., 1996).

### **1.3.4 VAMP-Homologe in niederen Eukaryoten**

Die These, dass es sich bei VAMPs um Proteine mit evolutionär konservierten zentralen Funktionen im Vesikeltransport handelt, wird insbesondere dadurch gestützt, dass diverse Homologe in Nicht-Säugetierzellen existieren (Gerst et al., 1992;Bennett and Scheller, 1993;Gerst, 1997).

Beispielsweise wurde im Rahmen von Untersuchungen zur RAS-abhängigen Signaltransduktion das SNC1-Gen in Hefezellen charakterisiert, dessen Genprodukt sich als Homolog des Säugetier-VAMP mit einer Sequenzübereinstimmung von ca. 40% zu VAMP-2 herausstellte (Gerst et al., 1992). Zusammen mit dem SNC2-Gen (Protopopov et al., 1993) spielt SNC1 (79%ige Sequenzhomologie zu SNC2) eine Rolle im Vesikeltransport zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran in *Saccharomyces cerevisiae* und ist Bestandteil dieser Transportvesikel. Obwohl eine jeweils isolierte Deletion des SNC1- oder SNC2-Gens keine offensichtlichen phänotypischen Konsequenzen zu haben scheint (Gerst et al., 1992), führt eine genetische Mutation in beiden Genen gleichzeitig zu einer Ansammlung von post-Golgi-Vesikeln vor der Plasmamembran und zur Aufhebung der Fähigkeit zur Vesikelsekretion. Andere Proteine im Vesikeltransportzyklus der Hefe, die kaum Sequenzhomologie (ca. 25%), jedoch ähnliche strukturelle Eigenschaften wie VAMP besitzen (Produkte des BOS1-, SEC22/SLY2- bzw. BET1/SLY12-Gens), übernehmen dagegen Funktionen auf früheren Stufen des sekretorischen Pfades wie dem Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat. Auch diese strenge Arbeitsteilung auf den verschiedenen Stufen des sekretorischen Pfades weist auf eine funktionelle Konservierung der Sekretionsmaschinerie bei niederen und höheren Eukaryonten hin.

Auch in *Drosophila* gibt es Synaptobrevin-(VAMP)-Homologe, die durch Screening von cDNA-Datenbanken identifiziert werden konnten. „Syb“ und „n-syb“ als in neuronalen Geweben vorherrschende Varianten sind bereits zu Beginn der synaptischen Entwicklung nachzuweisen (Chin et al., 1993; DiAntonio et al., 1993). Bei homozygoter Deletion des „n-syb“-Gens, die einer Nullmutation entspricht, kommt es zu einer fast vollständigen, letal endenden Paralyse des Embryos. Hierbei ist vor allem die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Neurotransmitter-Ausschüttung an der neuromuskulären Endplatte betroffen. Eine basale spontane Vesikelfusion von einzelnen Miniaturvesikeln im Sinne einer konstitutiven Exozytose bleibt trotz einer Reduktion um 75% in der Nullmutante erhalten (Deitcher et al., 1998).

## **1.4 Alternatives Spleißen**

### **1.4.1 Mechanismus und Bedeutung des alternativen Spleißens**

Neben VAMP-Isoformen, die sich in erster Linie in ihrem variablen N-terminalen Teil voneinander unterscheiden und verschiedenen Genorten zuzuordnen sind, konnten,

ähnlich wie zuvor bei *Drosophila*, auch bei Säugetierzellen VAMP-Isoformen beobachtet werden, die durch alternatives Spleißen des gleichen Gens entstehen und im C-terminalen Bereich differieren (Mandic et al., 1997). Der Mechanismus des alternativen Spleißens ermöglicht es, die zelluläre Funktion von Expressionsprodukten des gleichen Gens zu variieren. So können beispielsweise während bestimmter Entwicklungs- und Differenzierungsstadien unterschiedliche Spleiß-Muster vorherrschen und abhängig von externen Stimuli, wie zum Beispiel einer Depolarisation von Neuronen, in ihrer Expression beeinflusst werden (Nilsen and Graveley, 2010). Charakteristisch ist weiterhin die Gewebe-abhängige Regulation von Isoformen-Mustern, dabei weist gerade Hirngewebe eine immense Anzahl an funktionell bedeutsamen Spleiß-Isoformen auf, die zur Variabilität der Neuronentypen beitragen und eine Rolle bei der Axon- und Synapsenbildung spielen (Li et al., 2007).

Fehler, die im Zusammenhang mit dem Spleißen bestimmter Isoformen entstehen, können daher auch Krankheiten hervorrufen. Beispiele aus der Neurologie sind die spinale Muskelatrophie oder die frontotemporale Demenz, die zum Beispiel durch ein fehlerhaftes Spleißen der prä-mRNA des Mikrotubuli-assoziierten Tau-Protein-Gens verursacht sein kann (Li et al., 2007).

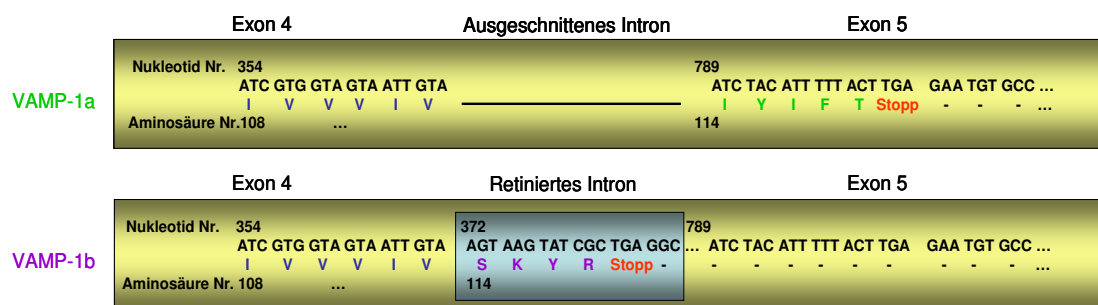
#### **1.4.2 Spleiß-Isoformen von VAMP-1**

Der für VAMP zunächst in *Drosophila* beschriebene Mechanismus des alternativen Spleißens konnte durch Screening von cDNA-Datenbanken nachgewiesen werden (Chin et al., 1993; DiAntonio et al., 1993). Bereits hier ergaben sich Hinweise darauf, dass der aus nur wenigen Aminosäuren bestehende C-Terminus des Synaptobrevin-Homologs „syb“ und seiner Isoform „n-syb“ eine Rolle in der Neurogenese spielen könnte.

In Säugetierzellen wurde der Nachweis des alternativen Spleißens bei VAMPs erstmals in der Ratte nachgewiesen. Hierbei konnte für die zwei VAMP-1 Isoformen VAMP-1a und VAMP-1b gezeigt werden, dass deren intravesikulärer C-terminaler Bereich durch alternatives Spleißen bestimmt wird (Abbildung 1.5).

Die beiden Isoformen sind Gewebe-abhängig unterschiedlich stark exprimiert: So ist VAMP-1a die vorherrschende Isoform in Hirn und Herz, während VAMP-1b in Geweben wie Milz, Parotis oder Pankreas überwiegt (Mandic et al., 1997). Auch für VAMP-2 konnte im Nachfolgenden die Existenz C-terminal differierender Isoformen

nachgewiesen werden, die sich in ihrer Gewebe-spezifischen Ausprägung unterscheiden (Mandic and Lowe, 1999). Als ein weiteres SNARE-Protein existiert beispielsweise auch Syntaxin 2 in verschiedenen Spleißvarianten, so ist zum Beispiel die Spleißvariante D von Syntaxin 2 die im Hirn vorherrschende Form (Quinones et al., 1999).



**Abbildung 1.5 Alternatives Spleißen mit Intronretention in VAMP-1, modifiziert nach Mandic und Kollegen (Mandic et al., 1997).** Links ist das in beiden Isoformen, VAMP-1a und -1b, enthaltene Exon 4 des VAMP-1 Gens dargestellt, welches die Transmembrandomäne des Proteins kodiert. Bei VAMP-1a schließt sich nach Entfernung des Introns direkt Exon 5 an. Die resultierende Aminosäuresequenz wird bei der Translation durch ein Stoppcodon nach fünf Aminosäuren (-IYIFT) terminiert. Bei VAMP-1b folgt auf Exon 4 die Sequenz des retinierten Introns, welches für vier Aminosäuren (-SKYR) kodiert, wonach ein Stoppcodon folgt. Die variablen C-terminalen Sequenzen beider Proteine ragen in das Innere des Transportvesikels. (Nukleotid-Nr. entsprechend GenBank Sequenz: U74621.1).

Im Falle von VAMP-1 handelt es sich um eine spezielle Form des alternativen Spleißens, bei welcher ein Intron im finalen Transkript retiniert wird, wobei hier eine Sequenz zwischen Exons 4 und 5 des VAMP-1 Gens betroffen ist (Chen and Manley, 2009; Nilsen and Graveley, 2010). Durch alternatives Spleißen kommt es zur Generierung von zwei Isoformen des Proteins nahezu gleicher Größe, während sich die entsprechende m-RNA in der Länge um 417 nt unterscheidet (Abbildung 1.5).

Neben der 1997 initial beschriebenen Säugetier-Isoform VAMP-1b wurden später, zum Teil in verschiedenen Geweben anderer Species, weitere Isoformen beschrieben, die ebenfalls Unterschiede im C-Terminus zeigten. Hierzu gehört eine im Nucleus cochlearis der Ratte isolierte VAMP-1 Isoform. Im Gegensatz zu den anderen bisher bekannten Spleiß-Varianten ist der hier entstehende intraluminale Anteil des Proteins mit 17 Aminosäuren vergleichsweise lang und besitzt zusätzlich zu seinen auffällig hydrophilen Resten zwei Serine als mögliche

Phosphorylierungsstellen für posttranslationelle Modifikationen (Friedland et al., 2008). Einen Hinweis auf die mögliche Funktion des intravesikulären C-Terminus lieferte eine Untersuchung von Isenmann und Kollegen, die zeigte, dass beim humanen VAMP-1 die Spleiß-Variante VAMP-1B, welche sich bezüglich der C-terminalen Sequenz von der Rattenisoform VAMP-1b unterscheidet, im Gegensatz zur ursprünglich beschriebenen Isoform VAMP-1A zu Mitochondrien sortiert wird (Isenmann et al., 1998). Ein Vergleich mit entsprechenden Mutanten legte außerdem nahe, dass diese Sortierung direkt mit den geänderten biochemischen Eigenschaften des C-Terminus (kürzeres hydrophobes Transmembransegment, höhere positive Ladung) zusammenhängt, was dazu führt, dass der von VAMP-1A bekannte intrazelluläre Transportweg über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran verlassen wird.

### **1.5 Zielsetzung**

Die Funktion verschiedener VAMP-Abschnitte ist bis heute nicht erschöpfend geklärt, da neben der Hauptbedeutung von VAMPs für die eigentliche Fusion des Vesikels mit der Zielmembran andere Funktionen im Bereich der Vesikelsortierung und Fusionsregulierung möglich scheinen. In diesem Zusammenhang ist die Bedeutung des variablen C-Terminus von VAMP-1a und VAMP-1b für die Funktion des Proteins trotz der signifikanten Änderung der intraluminalen Aminosäuresequenz bislang ungeklärt. Es ist daher möglich, dass der C-terminale intravesikuläre Anteil von VAMP-1b, ähnlich der humanen mitochondrialen Isoform, beispielsweise als intrazelluläres Sortierungssignal dient, welches sich von der bekannten Isoform VAMP-1a unterscheidet. Da es sich bei dem intraluminalen Abschnitt um eine sehr kurze Sequenz von nur vier Aminosäuren handelt, konnten bisher keine sequenzspezifischen Antikörper gegen den entsprechenden C-Terminus der einzelnen Isoform hergestellt werden. Das Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit war es daher, über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verschieden markierter VAMP-1a- und VAMP-1b- Proteine Anhaltspunkte auf Unterschiede in der subzellulären Lokalisation beider Isoformen zu erhalten, welche auf unterschiedliche zelluläre Funktionen beider Proteine hinweisen könnten.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien und Fertig-Kits

<b><u>BEZEICHNUNG</u></b>	<b><u>HERSTELLER</u></b>
Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Amphotericin B	BMS, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau (3,3',5,5'-Tetrabrom-phenolsulfonphthalein)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
EDTA (Ethyldiamin-tetraacetat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Foster City, CA, USA
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Fötales Rinderserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Gentamicin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Glycin	Sigma-Aldrich, Seelze
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin	Bio Whitaker, Verviers, Belgien
Lipofectamine® 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydroxid	Fisher Scientific, Leicestershire, UK
Neomycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP40)	Fluka, Steinheim
Opti-MEM®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Biochrom KG, Berlin
Penicillin G	Jenapharm GmbH & CO. KG, Jena
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Polyacrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Qiagen® Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamide:Bisacrylamid=37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
StrataClone™ PCR Cloning Kit	Stratagene Corp., La Jolla, CA, USA

Streptomycin	Fatol Arzneimittel GmbH, Greifswald
Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-HCL	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIzol Reagent®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin	BioChrom KG, Berlin
Trypton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylencyanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Yeast-Extrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

## 2.1.2 Geräte

<b><u>GERÄT</u></b>	<b><u>BEZEICHNUNG</u></b>	<b><u>HERSTELLER</u></b>
Absaugpipetten	Pasteur-Pipetten (150 mm)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Agarose-Gel-Kammer	BioMax MP 1015	Kodak GmbH, Stuttgart
Agarose-Gel-Spannungsgerät	BioMax MBP 300	Kodak GmbH, Stuttgart
Ausstreich-Ösen	Platin-Iridium-Öse 3 mm	Otto E. Kobe KG, Marburg
Autoklav	Fedegari Autoclavi	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Bakterienbrutschrank	Typ B12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Blot-Kammer	Mini Trans-Blot	BioRad Laboratories GmbH, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator Zellkultur	Function Line BB16	Heraeus Instruments, Hanau
Cryotubes	CRYO.S 2ml PP	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Drehrad-Rührer	Typ 3000	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Einmal-Skalpelle	Feather-Skalpell	pfm medical ag, Köln
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra, Isernhagen
Filme	CURIX™ HT 1.000 G Plus	Agfa, Mortsel, Belgien
Filmentwicklermaschine	Optimax Typ TR	PROTEC Medizintechnik GmbH & Co.KG, Oberstenfeld
Filmkassetten (13x18, 18x24 cm)	BLUE M2 CURIX screens	AGFA Graphics Germany GmbH & Co. KG, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.M2	Carl Zeiss GmbH, Jena
<i>Freezing Container</i>	Mr. Frosty™	Thermo Scientific
Gasbrenner	LABOGAZ 206	Campingaz, Hungen-Inheiden
Gefäße für Bakterienkultur	12 ml; Art.-Nr.: 184261	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gelelektrophorese-Apparatur	PROTEAN II xi (2D) Cell	BioRad Laboratories GmbH, München
Glas-Pipette	Hamilton-Mikroliter-Syringe 50 µl	Hamilton Bonaduz AG, GR, Schweiz
Heizblock	HBT 130	HLC BioTech, Bovenden
Inkubator-Shaker	Classic C24 Shaker Incubator	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA

Kühlschränke	1. VIP series -86°C, ULTRA LOW 2. (-4°C), MF (-20°C)	1. Sanyo, Bad Neudorf 2. PORKKA, Hollola, Finnland
Lichtmikroskop	Telaval 31	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer	stir CB161	Bibby Scientific Limited, Beacon Road, Stone, Staffordshire ST15 0SA, UK
Mikrowelle	SpaceCUBE50 M734	Philips Deutschland GmbH, Hamburg
Netzteile	PowerPac HC/ PowerPac 300	BioRad Laboratories GmbH, München
Nitrocellulose Transfer Membran	PROTRAN	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger Deckgläser	76x26 mm 24x50 mm (#1)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Petrischalen	Durchmesser: 10 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Photometer	Eppendorf BioPhotometer	Hinz GmbH, Hamburg
Photometer-Drucker	Thermal PRINTER DPU-414	Seiko Instruments GmbH, Neu-Isenburg
Pipettenspitzen	DIAMOND D1000, DL10, D200	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettierhilfen	pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettierhilfen	Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA
Präzisionswaage	Discovers DV 215 CD	OHAUS Corporation, Pine Brook, NJ, USA
Präzisionswaage	handy	Sartorius AG, Göttingen
Quarzküvette	Halbmikro-Einmalküvette	Eppendorf AG, Hamburg
Reagiergefäße	Microtube, Safe Seal (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml); Tubes 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reinstwasseraufbereiter	membraPure	Astacus GmbH & CoKG, Liederbach
Shaker	DUOMAX 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sterilbank	Kendro HS15	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Sterile Pipetten für Zellkultur	CellStar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Steriler Cell-Scraper	Länge: 16 cm	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Thermocycler	T-Professional	Biometra, Göttingen

TIRF-Mikroskop	Leica DMI 6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Tischzentrifuge	Z100M Labnet Spectrafuge Mini	HERMLE, Maschinenfabrik Berthold Hermle AG, Gosheim
UV-Auflagegerät	High Performance Ultraviolet Transilluminator	UVP, Upland, CA, USA
UV-Aufnahmegerät	Gel Doc 2000	BioRad Laboratories GmbH, München
UV-Küvetten	UVette	Eppendorf AG, Hamburg
Verschlussfolie	Parafilm® M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Vortexer	REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Waschmaschine	G 7883 CD (Miele Professional)	Miele Professional, Gütersloh
Wasserbad	Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH GFL, Burgwedel
Zellkulturschale	6-well flatt bottom cell +	Sarstedt, Newton, NC, USA
Zell-Zählkammer	Neubauer improved	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön
Zentrifugen	1. Universal 30 RF 2. Labofuge 400R	1. Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen 2. Heraeus Holding GmbH, Hanau

### 2.1.3 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen bzw. Puffer in ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

- *Lysispuffer:*

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
10% (v/v)	Glycerol
1% (v/v)	Nonidet P40 (NP40)
100 µl/ml	Protease Inhibitor Cocktail
50 µl/ml	Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2

- *10fach- Blot-Puffer (pH 8,5):*

25 mM	Tris-Base
0,2 M	Glycin
20% (v/v)	Methanol

- *10fach- Elektrophorese-Puffer für Proteingele:*

60,4 g	Trisbase
376,0 g	Glycin
20,0 g	SDS
> mit H <sub>2</sub> O auf 2 l	

- *Transfer-Puffer (pH 8,3):*

3,03 g	Trisbase
14,4 g	Glycin
> mit H <sub>2</sub> O auf 2 l	

- *5fach- TAE-Puffer für Agarose-Gelelektrophorese:*

24,2 g	Trisbase
5,7 ml	Eisessig
3,7 g	EDTA
> mit H <sub>2</sub> O auf 1 l	

- *Agarose-Gel (1,2 %):*

100 ml	1x TAE
1,2 g	Agarose
6 µl (1%)	Ethidiumbromid

- *PBS (Phosphate-buffered Saline) (pH 7,25):*

6,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,5 mM	KCl
140 mM	NaCl
Autoklaviert	

- *1fach- TBS:*

200 mM	Trisbase
	In NaCl

- *TBS/T - Waschpuffer:*

1x	TBS
0,1% (v/v)	Tween20

- *TBS/T - Blocking-Puffer:*

1x	TBS/T
5 % (w/v)	Magermilchpulver

- *Verdünnungslösung für 1. Antikörper:*

5 % (w/v)	BSA
0,1% (v/v)	Tween20
	10x TBS
	in H <sub>2</sub> O



- *LB-Medium/ Agarplatten:*

5 g	NaCl
5 g	Yeast-Extrakt
10 g	Trypton
	In 1l H <sub>2</sub> O (pH 7,0)
Ggf. + 15 g	Agar
Ggf. + Antibiotikum	100 mg Ampicillin/ 30 mg Neomycin

- *6fach- Ladepuffer für Agarose-Gele:*

5 ml	Glycerol (30%)
40 mg	Bromphenolblau
40 mg	Xylencyanol (0,25%)
3,7 mg	EDTA
> mit H <sub>2</sub> O auf 10 ml	

- *Nährlösung für Zellkultur:*

10%	FCS
1%	L-Glutamin
100 U/l	Penicillin
100 mg/ml	Streptomycin
	In Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)

### 2.1.4 Antikörper

BEZEICHNUNG	VERWENDUNG (VERDÜNNUNG)	HERSTELLER
VAMP-1 antibody (ab3346, rabbit polyclonal)	Western Blot (1:3000)	Abcam plc, Cambridge, UK
Aktin-Antikörper (A5316, mouse monoclonal)	Western Blot (1:4000)	Sigma-Aldrich, München
GFP antibody (ab1218, mouse monoclonal)	Western Blot (1:1000)	Abcam plc, Cambridge, UK
RFP = DsRed antibody (Cat. No. 632496, rabbit polyclonal)	Western Blot (1:666)	Clontech Living Colors, Mountain View, CA, USA
TOM20-Antikörper (sc-17764, mouse monoclonal)	Immunzytochemie (1:250)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
EEA1-Antikörper (sc-6414, goat polyclonal)	Immunzytochemie (1:250)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
MAP LC3beta- Antikörper (sc- 271625, mouse monoclonal)	Immunzytochemie (1:250)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
LAMP-3-Antikörper (sc-98657, rabbit polyclonal)	Immunzytochemie (1:250)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

BEZEICHNUNG	VERWENDUNG (VERDÜNNUNG)	HERSTELLER
bovine anti-goat IgG-R (sc-2349)	Immunzytochemie (1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
donkey anti-mouse IgG-R (sc-2300)	Immunzytochemie (1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-rabbit IgG-TR (sc-3925)	Immunzytochemie (1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005)	Western Blot (1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
goat anti-rabbit IgG- HRP (sc-2004)	Western Blot (1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

### 2.1.5 Standards und Probenpuffer

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
2x sample buffer Laemmli	2fach-Probenpuffer für SDS- Gele	Sigma-Aldrich, Steinheim
6x sample buffer	6fach-Probenpuffer für Agarosegele	Eigenherstellung (s.o., Abschnitt 2.1.3)
Precision Plus Protein- Standards (All Blue)	Molekulargewichtsstandard für 1-D SDS-PAGE	BioRad Laboratories, München
Quick-Load 100 bp-DNA- ladder	DNA-Fragmentlängen- Standard für Agarose-Gele	NewEnglandBiolabs, Ipswich, MA, USA
$\lambda$ DNA-HindIII Digest	DNA-Fragmentlängen- Standard für Agarose-Gele	NewEnglandBiolabs, Ipswich, MA, USA
$\Phi$ X174 DNA- Hae III Digest	DNA-Fragmentlängen- Standard für Agarose-Gele	NewEnglandBiolabs, Ipswich, MA, USA

Die Probenpuffer werden zum einen dazu verwendet, um das Einfüllen der Proben in die Gelkammern durch Einsatz einer Trägersubstanz höherer spezifischer Dichte (z.B. Glycerol) zu ermöglichen. Zum anderen sorgen sie mithilfe der enthaltenen Farbstoffe für eine Anfärbung der laufenden Probe in einer definierten Höhe. Dies führte im Falle der VAMP-haltigen Probe bei kleineren Probenkonzentrationen zu einer Maskierung der entsprechenden Bande im Agarosegel durch die ähnlich schnell laufende Bromphenolblau-Bande des Puffers. Daher wurde bei der Herstellung des Puffers für die Anwendung bei diesen Proben auf Bromphenolblau verzichtet.

### 2.1.6 Oligonukleotide (*Primer*) für die PCR

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mithilfe des Online-Programms *Net Primer* (PREMIER Biosoft International) entsprechend ihrer gewünschten Eigenschaften erstellt und schließlich von der Firma Invitrogen gemäß diesen Vorgaben produziert. Um die Effektivität der eingesetzten Enzyme so hoch wie möglich zu halten und damit Fehler oder eine Behinderung der anschließenden PCR zu verhindern, wurde darauf geachtet, beim *Primer*-Aufbau mindestens eines bis optimal sechs Nukleotide zwischen Anfangsnukleotid und der spezifischen Schnittstelle des Enzyms zu platzieren. Nur so wird eine >75%ige Effektivität, speziell des Enzyms HindIII, unter optimalen Inkubationsbedingungen erzielt. Abhängig von der gelieferten Ausgangskonzentration wurden die *Primer* in speziell für PCR aufgereinigtem entionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst, um eine Konzentration von 50 pmol/μl zu erhalten. Von dieser Lösung wurde in der PCR dann jeweils 1 μl bei einem Gesamtvolumen von 50 μl (1 pmol) eingesetzt.

Name des Primers	Sequenz 5' => 3'
HindIII-V1-forward	TTACA <b>AAGCTT</b> CGATGTCTG CTCCAGCTCAGCCACCTGC
EcoRI-V1a-reverse complement (rc)	<b>AGAATTC</b> GATCAAGTAAAA ATGTAGATTACAATTA
EcoRI-V1b-reverse complement (rc)	<b>AGAATTC</b> GATCAGCGATACTTACT TACAATTACTACCACGATGATGG

(Enzym-Schnittstellen **fett** unterlegt)



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Klonierung der VAMP-1 Spleiß-Varianten in Fluoreszenzvektoren

Um die subzelluläre Verteilung der beiden Spleiß-Varianten in lebenden Zellen sichtbar machen zu können, wurden die gesamten Kodierungssequenzen der beiden VAMP-1-Spleiß-Varianten in geeignete Expressionsvektoren subkloniert.

Es wurde hierzu ein Vektor für das grüne Fluoreszenzprotein ausgewählt, das ursprünglich in der Qualle *Aequorea victoria* charakterisiert wurde und bei Anregung durch blaues Licht grün fluoresziert (Shimomura et al., 1962). Als dessen Äquivalent in anderem Fluoreszenzbereich wurde eine modifizierte Variante des aus der Koralle *Discosoma* stammenden roten Fluoreszenzproteins genutzt (Matz et al., 1999; Baird et al., 2000), um eine etwaige Kollokalisierung mit Überlappung der markierten Zellkompartimente darzustellen.

Da die für ein potentielles Sortierungssignal in Frage kommende Proteinsequenz des VAMP-1 im C-terminalen Abschnitt liegt, musste bei der Klonierung dafür Sorge getragen werden, dass die Fusion mit dem jeweiligen Expressionsvektor am N-terminalen Abschnitt der VAMP-1-Sequenz stattfindet, während der C-Terminus in seiner möglichen Funktion unbeeinträchtigt bleibt.

Zur Erzeugung der beiden unterschiedlichen Isoformen als *Insert* wurde die gewünschte Sequenz mithilfe einer vorangehenden Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und die kompatiblen Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur Klonierung mithilfe von entsprechenden *Primern* eingebracht. Als *Template* diente ein die VAMP-1a Sequenz kodierender Vektor, der uns freundlicherweise von Prof. W. Trimble (University of Toronto, Canada) überlassen wurde.

Für die Herstellung beider Varianten des *Inserts* konnte hier derselbe 5'-*Primer* verwendet werden, weil sich die beiden Isoformen nur im C-terminalen Abschnitt des Proteins unterscheiden. Da es sich um eine begrenzte Anzahl von am 3'-Ende differierenden Nukleotiden handelte, war es möglich, diese Nukleotidsequenz der jeweiligen Isoform direkt über den entsprechenden *Primer* in das PCR-Produkt einzuführen (Abbildung 2.1, A).

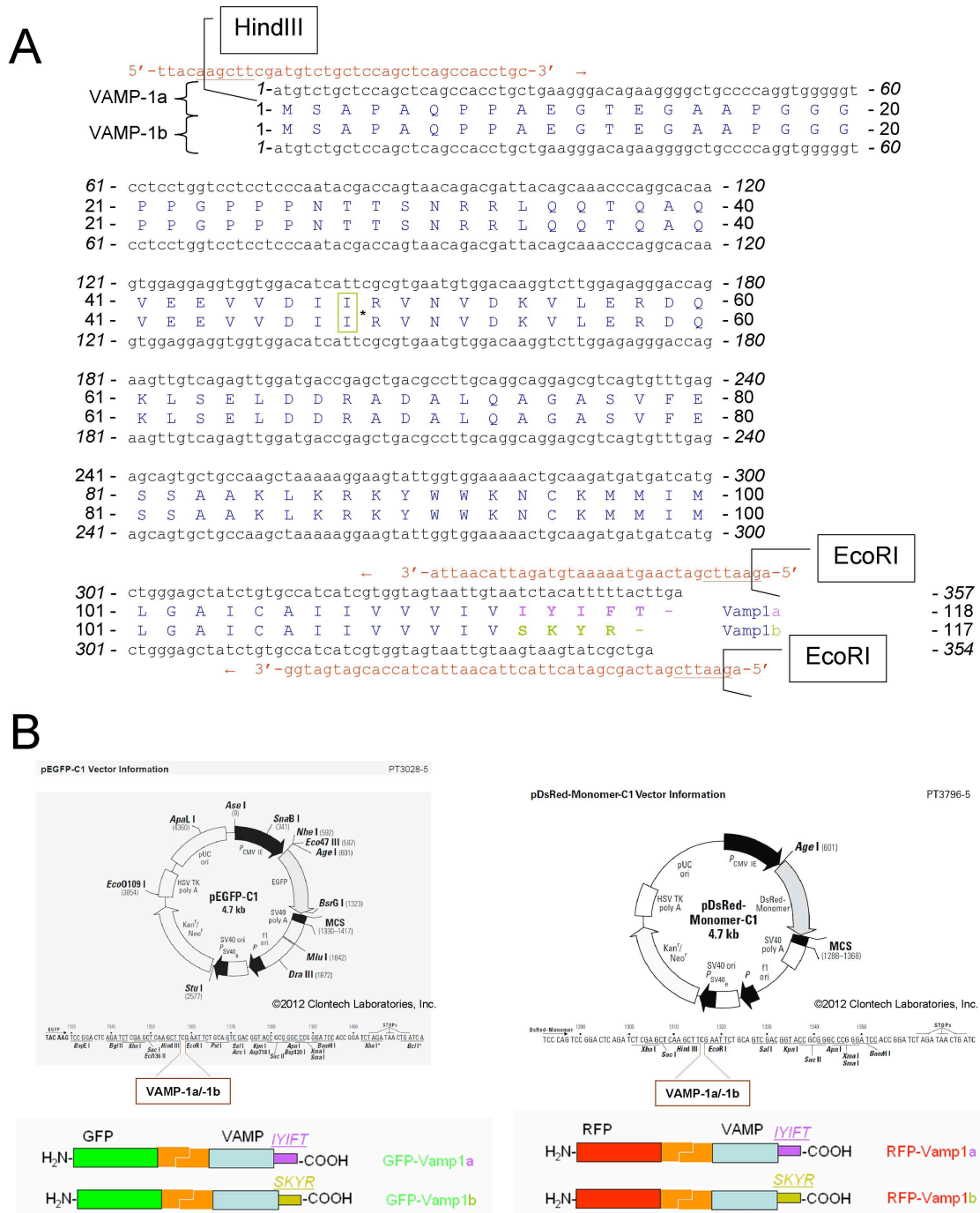
Zum Entwurf der entsprechenden *Primer* für die PCR wurde die Software *Primer Premier 5.0* (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) genutzt. Beim Entwurf insbesondere des 5'-*Primers* wurde darauf geachtet, dass es während der Fusion nicht durch Hinzufügen zusätzlicher Nukleotide innerhalb des *Primers* zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit einer fehlerhaften Translation des

VAMP-1-Fusionsproteins kommen konnte. Weiterhin mussten im HindIII-*Primer* zusätzliche Nukleotide vor der Schnittstelle addiert werden, um zu gewährleisten, dass das Enzym sich anlagern und ein effizienter Verdau stattfinden kann (Moreira and Noren, 1995).

Als Restriktionsenzyme dienten EcoRI und HindIII, welche den Vektor sowie das Insert an definierter Stelle jeweils genau einmal schneiden. Hierdurch entstehen sogenannte *sticky ends*, überhängende Enden von komplementärer Sequenz, die während der anschließenden Ligation wieder hybridisieren und dazu führen, dass das *Insert* nur in einer festgelegten Richtung in das Plasmid eingebaut werden kann. Nach Aufreinigung des Doppelverdaus von Vektor und Insert über ein Agarosegel wurde bei der Ligation ein Fusionsvektor erzeugt, bei dem im translatierten Protein die Aminosäuresequenz von VAMP-1 C-terminal auf den fluoreszierenden Anteil folgt (Abbildung 2.1, B).

### **2.2.2 Expression der VAMP-1 Konstrukte in Säugetier-Zelllinien**

Nach Herstellung der oben beschriebenen Konstrukte wurden diese mit Lipofectamine® 2000-Transfektionsreagenz in ausgewählte Säugetier-Zelllinien transfiziert und somit zur Expression gebracht. Mittels Fluoreszenzmikroskopie war es anschließend möglich, die Fusionsprodukte einzeln und in Doppeltransfektion innerhalb der Zelle darzustellen. Zur Transfektion wurden HeLa-Zellen und COS-7 Zellen gewählt, da diese sich unter den gegebenen Transfektionsbedingungen durch die vergleichbar höchste Transfektionseffizienz bei relativ schnellem Wachstum auszeichnen.



**Abbildung 2.1 Generierung von GFP- bzw. RFP-VAMP-1a und -1b Konstrukten.** (A) Dargestellt sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von VAMP-1a und -1b im Vergleich. Gezeigt in rot sind die in der PCR eingesetzten *Primer*, wobei der im 5'-Bereich eingesetzte *Primer*, welcher eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease HindIII enthält, bei beiden Isoformen identisch ist. Die im 3'-Bereich eingesetzten *Primer* sind hingegen spezifisch für die jeweilige Isoform und enthalten eine Erkennungssequenz für EcoRI. VAMP-1a unterscheidet sich von VAMP-1b im C-Terminus des Proteins. (B) Der Bereich der Ligation der VAMP-1a bzw. -1b Sequenz (zwischen HindIII und EcoRI) im Bereich der MCS (*Multiple Cloning Site*) der Vektoren pEGFP-C1 und pDsRed-Monomer-C1 sowie der schematische Aufbau der rekombinanten Fusionsproteine ist farblich hervorgehoben. (Die Nutzung der Vektorinformationen in dieser Abbildung erfolgte mit freundlicher Genehmigung der Firma Clontech Laboratories, Inc.). \*möglicher Polymorphismus (I bzw. M), in beiden Konstrukten identisch (I).



### 2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Zum Nachweis der Expression spezifischer Gene ist die Polymerase-Ketten-Reaktion eine einfache und etablierte *in vitro* Methode, die vollautomatisch mittels eines Thermocycler abläuft. Sie ist jedoch auch eine wichtige Möglichkeit zur exponentiellen Vervielfältigung von sehr kleinen DNA-Mengen zur Generierung von definierten DNA-Abschnitten, die bei der experimentellen Klonierung eingesetzt werden können.

Hier diente sie zur Herstellung der beiden zur Fusion mit Fluoreszenz-Vektoren bestimmten DNA-Abschnitte von VAMP-1a bzw. -1b. Durch entsprechenden Primereinsatz konnte leicht die benötigte Sequenz hergestellt werden, die sich nur durch wenige Basenpaare am C-Terminus unterscheidet. Als *template* oder Matrize wurde das VAMP-1a Plasmid (freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. W. Trimble) benutzt, die *Primer* wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Ansatz von 100 µl einer PCR Reaktion:

50 µl	REDTaq® ReadyMix™ (enthält Polymerase, Nukleotide = dATP/dGTP/dCTP/dTTP, Puffer mit MgCl)
45 µl	H <sub>2</sub> O aus REDTaq® ReadyMix™
1 µl	Template (VAMP-1a -Plasmid), ca. 0,1 µg
Je 2 µl	<i>Primer</i> (conc. 50 pmol/µl)  - für VAMP-1a : HindIII-V1-forward + EcoRI-V1a-reverse complement (rc)  - für VAMP-1b: HindIII-V1-forward + EcoRI-V1b-reverse complement (rc)

Nach einer anfänglichen Hitzedenaturierung der zu amplifizierenden DNA (90-95 °C) können sich die dem Beginn der herzustellenden DNA-Sequenz entsprechenden Oligonukleotide (*Primer*) anlagern (*Annealing*). Die dafür gewählte Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur des Primers. Anschließend kann im folgenden sogenannten Extensionsschritt (72 °C) mithilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase (Enzym des Bakteriums *Thermophilus aquaticus*) die Synthese des Komplementärstranges stattfinden, bei dem bis zu 1000 Nukleotide aus dem Reaktionsgemisch pro Minute verknüpft werden.

Folgender Zyklus wurde 40-mal automatisch durchlaufen (Thermocycler T Professional, Biometra):

- 1 min 96°C (Denaturierung)
- 2 min 60°C (Annealing)
- 3 min 72°C (Extension)

=> 15 min 72°C, danach Kühlung auf 4°C

Die entstandenen DNA-Fragmente werden anschließend durch eine Aufreinigung mittels einer Agarose-Gelelektrophorese isoliert, indem sie im Gel direkt selektiert und daraus extrahiert wurden.

### **2.2.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

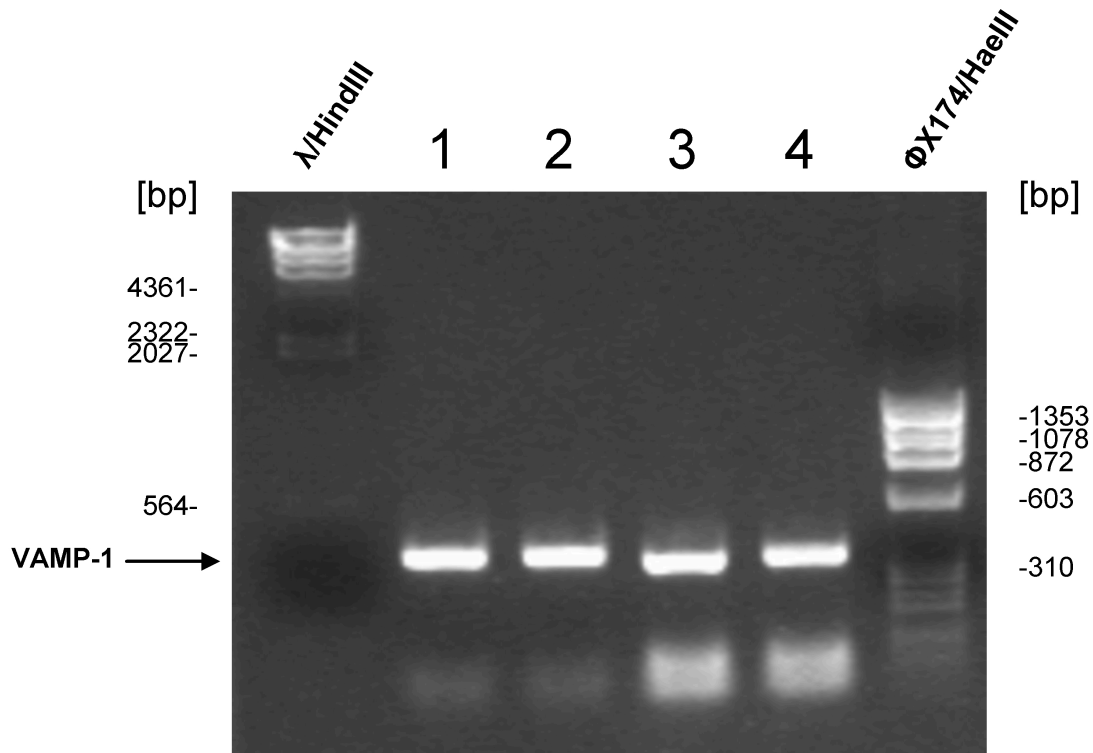
Zur Erfolgskontrolle einer Ligation, zur Aufreinigung mit nachfolgender Gel-Extraktion von gewünschten DNA-Fragmenten nach PCR, von Plasmid sowie PCR-Produkt nach Restriktionsverdau wird die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt.

Hierzu wird zunächst das Agarose-Gel in einer Konzentration, abhängig von der Größe des interessierenden DNA-Fragments, gegossen. Bei einer 1,2%igen Konzentration beispielsweise wurden 1,2 g Agarose in 100 ml 1xTAE für ca. 1,5 Minuten in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis sich das Agarosepulver gelöst hatte. Dann wurden 6 µl Ethidiumbromid hinzugefügt, welches die Detektion der DNA ermöglicht. Nachdem die hergestellte Agarose-Lösung in eine Elektrophorese-Spange gegossen und die Kämme eingesetzt worden waren, musste das Gel für ca. 20 Minuten aushärten. Das Gel wurde dann mit TAE-Puffer übergossen, welches ebenfalls Ethidiumbromid enthielt (10 µg / 100 ml TAE Puffer).

Als Standard wurden definierte Fragmente eines Restriktionsverdaus durch die Enzyme HindIII und HaeIII (NewEnglandBiolabs, Ipswich, MA, USA) benutzt (1 µl Standardlösung + 9µl H<sub>2</sub>O + 2µl 6xPuffer = 12 µl). PCR-Produkte konnten aufgrund des im ReadyMix<sup>TM</sup> zugesetzten farbigen Ladepuffers direkt in die entsprechenden Taschen des Agarose-Gels pipettiert werden, während andere Proben wie zum Beispiel extrahiertes Plasmid zunächst ebenfalls mit 1/5 Volumenteil 6fach-Puffer versetzt werden mussten.

Die Proben liefen bei einer konstanten Spannung von 120 V durch das Gel, wurden gemäß ihrer Länge aufgetrennt und mithilfe von UV-Licht von 254 nm sichtbar

gemacht, das den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid entsprechend des DNA-Gehaltes im Gel nachweist (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2 Generierung von VAMP-1a und VAMP-1b Amplikons für die Subklonierung in GFP- und RFP-Vektoren.** Mittels der Primer *HindIII-V1-forward* und *EcoRI-V1a-rc* wurden PCR-Produkte (Amplikons) generiert, welche den gesamten offenen Leserahmen (*Open Reading Frame*) von VAMP-1a beinhalten (Spur 1+2). Entsprechend wurden für die Generierung des VAMP-1b Amplikons die Primer *HindIII-V1-forward* und *EcoRI-V1b-rc* eingesetzt (Spur 3+4). Die Auftrennung der PCR-Banden wurde in einem 1,2%igen Agarosegel vorgenommen. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Zugabe von Ethidiumbromid. Die entsprechenden VAMP-1 Banden (Pfeil) wurden ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Zum Größenvergleich wurden Standards mitgeführt (links:  $\lambda$ /HindIII, rechts:  $\Phi$ X174/HaeIII). Die erwartete Größe des Amplikons beträgt 378 bp für VAMP-1a und 375 bp für VAMP-1b.

### 2.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nachdem die entsprechenden Fragmente durch Auftrennung in der Elektrophorese isoliert worden sind, können sie zum Beispiel mithilfe des QIAGEN®-Gel-Extraction-Kits eluiert werden.

Dazu wurden die Ziel-Banden zunächst mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und gegen ein leeres Tube gewogen, um das Gewicht des Gelstückes zu bestimmen. Daraufhin wurden 3 Gewichtsteile QG-Puffer zugegeben und das Gel im Puffer für 10 Minuten im Heizblock bei 50°C vollständig gelöst. Nach Zufügen eines weiteren Gewichtsteiles Isopropanol wurde die Lösung à 750 µl auf eine QIAquick *spin column* gegeben. Nach 1 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und 500 µl QG-Puffer zugegeben. Eine weitere Minute wurde bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und daraufhin mit 750 µl PE-Waschpuffer aufgefüllt. Wieder folgte eine einminütige Zentrifugation (13.000 rpm) mit Verwerfen des Unterstandes. Durch eine letzte Minute bei 13.000 rpm in der Zentrifuge wurde der Ethanol-haltige Waschpuffer vollständig entfernt, um nicht bei späteren Reaktionen als Inhibitor fungieren zu können. Die Säule wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die in der Säule gebundene DNA durch 30 µl Elutionspuffer gelöst und durch anschließende einminütige Zentrifugation als Eluat gesammelt. Das Produkt konnte dann bei -20°C gelagert werden.

### 2.2.6 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Es wurden für einen präparativen Doppelverdau zur späteren Ligation 2,5 µl des jeweiligen Enzyms EcoRI und HindIII (entsprechend 50 units) sowie 25 µl des zu schneidenden Plasmids beziehungsweise PCR-Produktes pipettiert. Desweiteren wurden 5 µl 10fach-Puffer hinzugefügt, wobei man unter Beachtung der Herstellerangaben in dieser Enzymkombination den EcoRI-Puffer verwendet. Bei einem Gesamt-Ansatzvolumen von 50 µl wurden die restlichen 15 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad.

### 2.2.7 Ligation

Zur Vervielfältigung von DNA muss diese in Bakterien eingebracht werden. Dies ist im Allgemeinen nur nach Schluss der linearisierten DNA zu einem ringförmigen

Plasmid möglich. Die im Restriktionsverdau entstandenen *sticky ends* werden nach Aufreinigung im Agarose-Gel durch eine Ligase kovalent verknüpft.

Dazu wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Vektor (pEGFP-C1 bzw. pDsRed-Monomer-C1)	2 µl
Insert (VAMP-1a bzw. VAMP-1b cDNA)	6,5 µl
10fach-Ligase-Puffer	1 µl
T4-Ligase	0,5 µl

> Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

## 2.2.8 Transformation und Anzucht kompetenter Bakterien

Als zur Transformation befähigte Bakterien, sogenannte *competent cells*, wurde standardmäßig der E. coli-Stamm DH5α<sup>TM</sup> eingesetzt. Die entsprechende DNA bzw. das Plasmid wurden hierbei mittels eines Hitzeschocks in die Bakterien eingebracht (chemische Transformation).

Dazu wurden die DH5α<sup>TM</sup>-Zellen langsam auf Eis aufgetaut und zu je 50 µl in vorgekühlte Röhrchen pipettiert. 1 µl des Plasmids bzw. 5 µl des Ligationsproduktes wurden daraufhin zur Bakterienlösung hinzupipettiert. Danach wurde der Ansatz für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der Plasmide in die Bakterienzellen zu ermöglichen, erfolgte eine anschließende Inkubation für 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad (Hitzeschock). Danach wurden die Bakterien wiederum für 3 Minuten auf Eis gekühlt, bevor dann je 1 ml flüssiges LB-Medium ohne Antibiotikum pro Tube hinzugefügt wurde. Für die nächsten 45 Minuten wurde die Bakteriensuspension bei 37°C im Schüttelinkubator zur Anzucht inkubiert.

## 2.2.9 Plattierung und Picken von Kolonien

Um die transformierten Bakterien anschließend mithilfe von Antibiotika-haltigen Nährböden entsprechend den eingeführten Resistenzgenen zu selektionieren, wurden sie mittels eines sterilen Spatels (Drigalskispatel) gleichmäßig auf Agarplatten aufgebracht, wobei ca. 100 µl der Bakteriensuspension pro Platte eingesetzt wurde. Um eine höhere Dichte der Kolonien bei gleichem Volumen der eingesetzten Bakteriensuspension zu erreichen wurde diese zunächst für 5 min bei 3800 U/min zentrifugiert wonach 600 µl des zellfreien Überstands abpipettiert und das Bakterienpellet im restlichen Medium resuspendiert (konzentriert) wurde.

Nach einem Wachstum über Nacht konnten die entstandenen Kolonien nun in Flüssigkulturen überführt werden, um eine weitere Selektion einzelner Zellklone zu erreichen. Dazu wurden die ausgewählten Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze berührt und anschließend in 5 ml (für einen Miniprep) bzw. 50 ml (für einen Midiprep) LB-Medium getaucht, das mit einer entsprechenden Menge an Antibiotikum versetzt war.

Vor der anschließenden Plasmid-Isolierung konnte nach Bedarf ein kleiner Teil dieser Flüssigkultur von transformierten Bakterien in einem Glycerol-*stock* konserviert werden. Dazu wurde die Suspension mit 30% (v/v) Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert. Auch nach längerer Lagerung ist es so einfach möglich, aus dem Glycerol-Stock eine neue Flüssigkultur der transformierten DH5α<sup>TM</sup> Bakterien in LB-Medium herzustellen.

### **2.2.10 Plasmid-Isolierung aus Bakterien**

Nachdem ein definiertes Plasmid (beispielsweise nach Ligation) durch die Transformation in kompetenten Bakterien vervielfältigt worden ist, kann die gewünschte DNA anschließend aus den Bakterien isoliert werden. Dazu muss sie aus den angezüchteten Bakterien durch Lysierung direkt extrahiert werden, was hier mittels Einsatz des QIAGEN-Plasmid-Extraction-Kits (Miniprep aus 5 ml, Midiprep aus 50 ml Übernachtskultur) erfolgte.

Zunächst wurde für einen Midiprep die Übernachtskultur der plasmidproduzierenden *E. coli* in LB-Medium in zentrifugengängige Falcon-Röhrchen umgefüllt, so dass die Bakteriensuspension für 15 Minuten bei 4 °C in 3000 U/min zentrifugiert werden konnte. In 4 ml des Resuspensionspuffers P1, dem zuvor RNase A (100 µg/ml) hinzugefügt worden war, wurden die entstandenen Pellets aufgeschwämmt, bis keine Klumpen mehr sichtbar waren. Danach wurden ebenfalls 4 ml des Lysepuffers P2 dazugegeben und das Röhrchen mehrmals vorsichtig durchmischt, um die Bakterienzellen aufzuschließen. Als nächstes folgten noch 4 ml des auf 4 °C vorgekühlten Neutralisationspuffers P3 mit anschließendem vorsichtigem Durchmischen.

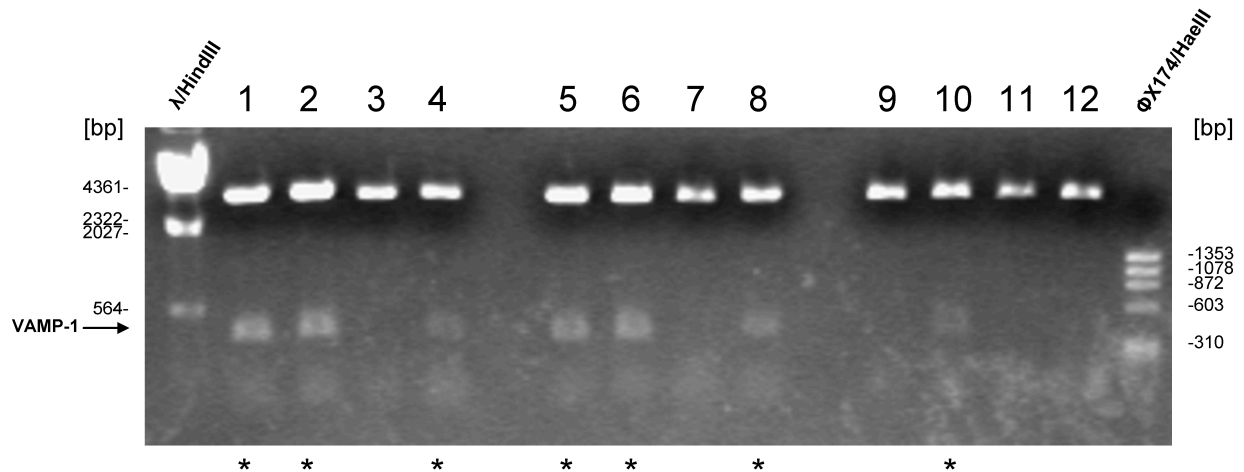
Das entstandene Zelllysat wurde daraufhin in einem QIAfilter MidiCartridge, das zunächst durch einen Stopfen verschlossen blieb, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Filtrationssäulen (QIAGEN®-tips) equilibriert, indem 4 ml QBT-Equilibrierungspuffer hineingegeben und nur per

Schwerkraft durchlaufen gelassen wurden. Nach der Inkubationszeit konnte der Inhalt des Cartridges mit Hilfe des Injektionsstempels in die equilibrierte QIAGEN-tip entleert werden. Der Durchlauf wurde verworfen und danach die Säule zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen. Um die auf der Säule gebundene DNA zu eluieren, wurden 5 ml des QF-Elutionspuffers durch die Säule geschickt und der Unterstand in einem neuen Tube aufgefangen. Nach Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und anschließendem Vortexen wurde das Eluat für eine Stunde bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen, der Ansatz mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und danach erneut für diesmal 20 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Bevor sich das entstandene Pellet vom Boden lösen konnte, wurde der Überstand zügig dekantiert und das Pellet für kurze Zeit an der Raumluft getrocknet. Nachdem letzte Reste von verbliebenem Ethanol per Pipette entfernt worden waren, wurde das Pellet in 200 µl Tris-HCl (pH 8,5) aufgenommen.

### 2.2.11 Screening und Sequenzierung

Um den Erfolg der Ligation und anschließenden Transformation in *E. coli* beurteilen zu können, wurde die aus der Bakterienkultur isolierte DNA einem *screening* unterzogen. Nach der erfolgreichen Transformation sollte das entsprechende Plasmid in modifizierter Form, das heißt inklusive des VAMP-Inserts, von der Bakterienzelle produziert worden sein. Um dies nachzuweisen, konnte die isolierte DNA erneut im Restriktionsverdau durch dieselben Enzyme EcoRI und HindIII aufgeschnitten werden. Das Vorhandensein des Inserts als entstandenes Fragment entsprechender Größe bestätigt dann die erfolgreiche Ligation (Abbildung 2.3).

Neben dem vorläufigen Screening der hergestellten DNA im Agarosegel musste diese jedoch zur endgültigen Validierung zusätzlich sequenziert werden, um etwaige Fehler, die Schnitt- und Ligationsstellen von Vektor und Insert betreffen, auszuschließen. Diese Sequenzierung wurde von der Firma 4BaseLab (Reutlingen), vorgenommen, anschließend konnten die entsprechenden Sequenzen mit der Online Software *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) verglichen werden (Corpet, 1988).



**Abbildung 2.3 Agarosegel nach Doppelverdau von 17 µl isolierter DNA (Mini-Prep) mit EcoRI und HindIII.** Positiv erscheinen die Proben in *Lane* 1, 2, 4, 5, 6, 8 und 10 durch Darstellung einer zusätzlichen Bande entsprechender Höhe. Größenstandards (λHindIII bzw. ΦX174/HaeIII) zum Vergleich sind links und rechts dargestellt.

### 2.2.12 Zellkultur und Arbeit mit Zelllinien

Die bei -196°C in Kryotubes gelagerten Zelllinien wurden bei 37°C aufgetaut (Handwärme oder im Wasserbad). Anschließend wurden die Zellen in 10 ml reinem Kulturmedium (DMEM) gewaschen (300 g, 5 min), um das im Gefriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Das Zellpellett wurde anschließend in frischem DMEM resuspendiert und die Zellen auf Kulturschalen ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte in 10 cm-Zellkulturschalen unter Standardbedingungen im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit). Das Anwachsen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert, wobei alle 2-4 Tage ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Vor Weiterverarbeitung der adhärent wachsenden Zellen (COS-7, HeLa), mussten die Zellen vom Boden der Zellkulturschale gelöst werden. Hierzu fand zunächst eine Spülung der Zellen mit PBS statt, um Proteaseinhibitoren, welche sich im Serum des Nährmediums befinden, auszuwaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit Trypsin, welches über eine enzymatische Reaktion die Proteinbindungen zwischen den einzelnen Zellen und dem Boden der Zellkulturschale löst. Es wurden 1-2 ml einer vorgefertigten Trypsin-Lösung auf den Zellrasen gegeben und die Platten für 10-30 min im Brutschrank belassen, bis sich die Zellen (mikroskopisch sichtbar) vom Boden gelöst



hatten. Alternativ zur Trypsinisierung wurden Zellen auch mithilfe eines Zellschabers in einigen Millilitern Medium mechanisch von der Kulturschale abgeschabt. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese nach Trypsinisierung in frischem DMEM aufgenommen und mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutz versetzt. Nach Aliquotierung in Kryotubes erfolgte eine Abkühlung der Tubes zunächst langsam auf  $-86^{\circ}\text{C}$  (*Freezing Container Mr. Frosty<sup>TM</sup>*) mit anschließender Umlagerung und Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.13 Transfektion von Zelllinien

Die Transfektion bewirkt das Einbringen von heterologer DNA in eukaryontische Zellen. Gene, die im transfizierten Vektor liegen, können so vom Transkriptions- und Translationsapparat der Zelle exprimiert werden.

Zur Transfektion von COS-7 und HeLa wurden  $1-2 \times 10^5$  Zellen pro Schale einer 6-*well*-Multischale verwendet. Nach Trypsinisierung sowie vorsichtiger Spülung mit PBS wurden die suspendierten Zellen in je 2-5 ml Medium aufgenommen und anschließend ein kleiner Tropfen der Suspension zur Zählung verwendet. Hierzu wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt, bei der zwei große Quadrate (Volumen  $0,1 \mu\text{l}$ ) ausgezählt wurden und der Mittelwert gebildet wurde. Aus der erhaltenen Zellzahl konnte so die Menge an Zellsuspension errechnet werden, die zur Anzüchtung in der 6-*well*-Schale genommen werden musste ( $1,5 \times 10^5$  Zellen). Das entsprechende Volumen der Suspension wurde dann in 3 ml DMEM in die Schale pipettiert, wo die Zellen auf der Oberfläche eines eingelegten Deckgläschens anschließend anwuchsen. Für die transiente Transfektion wurden die Zellen bis zu einem Stadium wachsen gelassen, in dem zum Transfektionszeitpunkt auf der Schale ca. 90 % Konfluenz erreicht waren (normalerweise einen Tag später).

Es existieren verschiedene Methoden zur Transfektion, die sich in ihrem Mechanismus zur Übertragung der Fremd-DNA ins Zellinnere und den Zellkern unterscheiden- beispielsweise die Elektroporation, Calciumphosphatpräzipitation oder Lipofektion. Im vorliegenden Falle wurde die Lipofektion eingesetzt, um den entsprechenden Vektor (GFP/RFP-VAMP-1a/b) in Säugetierzellen einzuschleusen. Die DNA bildet hierbei einen Komplex mit dem Lipofectamin 2000®-Reagenz und kann so in die Zelle aufgenommen werden.

Zunächst wurden pro *well* einer 6-*well*-Schale 4  $\mu\text{g}$  DNA sowie 10  $\mu\text{l}$  Lipofectamin getrennt in je 250  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium verdünnt und für 5 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Um den Komplex herzustellen, wurden dann DNA- und Lipofectamin-Lösung zusammengegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Komplex wurde dann auf die kurz zuvor mit 1,5 ml serumhaltigem Medium versorgten Zellen pipettiert. Nach mindestens 5 h im 37°C-Brutschrank (maximal 24 h) wurde das Medium noch einmal ausgetauscht, bis die Zellen nach weiteren 48 h unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden konnten.

#### **2.2.14 Immunzytochemie**

Die transfizierten Zellen wurden etwa 48 h (im Allgemeinen frühestens nach 24 h) nach der Transfektion für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Dazu wurden die Zellen noch in der 6-well-Schale zweimal für fünf Minuten mit 1-2ml PBS gewaschen, das danach abgesaugt wurde. Es erfolgte eine Fixierung der Zellen in -20°C kaltem Methanol sowie nachfolgender zweimaliger Spülung in PBS und H<sub>2</sub>O. Nun konnten die Deckgläschen, auf deren Oberfläche die Zellen gewachsen waren, mit einem Tropfen MountainDew-Fluoreszenz-Medium überschichtet werden und vorsichtig mit der überschichteten Seite auf den zuvor beschrifteten Objektträger gebracht werden. Um das Deckgläschen rutschfest anzubringen, wurden die Ränder nach dem Antrocknen mit Klarlack auf dem Objektträger fixiert.

Wenn die Zellen zusätzlich zum transfizierten Fluoreszenzvektor eine immunzytochemische Färbung von Zellorganellen durch Antikörper erhalten sollten, wurden sie nach der Transfektion ebenso zunächst dreimal für 5 min in PBS gewaschen und danach für 15 Minuten in gekühltem Methanol fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 2 Minuten in PBS wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 15 Minuten in einer Lösung von 3% BSA/0,3% NP40 in PBS inkubiert. Anschließend folgte die eigentliche Inkubation in selbiger Lösung für 1 h mit dem Erst-Antikörper (1:250), der sich gegen den entsprechenden Marker der jeweiligen Zellorganelle richtet. Bevor der Zweit-Antikörper aufgebracht werden konnte, erfolgte zunächst eine dreimalige Waschung für 5 Minuten mit obiger Lösung. Es schloss sich eine Inkubation mit dem Zweit-Antikörper für 1 h (1:500, gleicher Puffer wie beim Erst-Antikörper) an. Dies und die folgenden Vorgänge wurden unter Lichtschutz (Abdeckung mit Aluminiumfolie) durchgeführt, um eine vorzeitige Ausbleichung des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Nach der zweiten Inkubation wurden die Zellen erneut dreimal fünf Minuten in der obigen Lösung gewaschen, anschließend genauso lange in PBS und abschließend in ddH<sub>2</sub>O. Wenn die Zellen zusätzlich eine

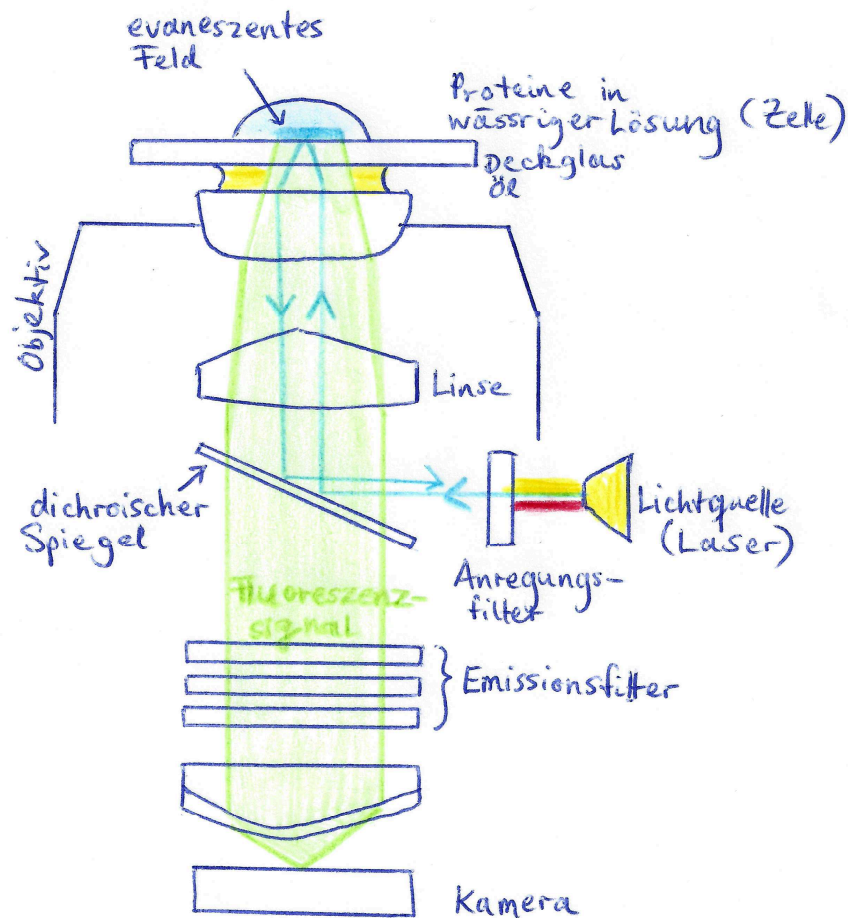
DNA-(Kern)-Färbung erhalten sollten, wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen für 10 min mit DAPI (1µg/ml) auf dem Schüttler inkubiert. Die Deckgläschen mit den entsprechenden Zellen konnten nun, wie oben beschrieben, auf die Objektträger aufgebracht werden. Sie wurden daraufhin bis zur Dokumentation am Fluoreszenzmikroskop in einer lichtgeschützten Box bei 4°C aufbewahrt. Als Hintergrundkontrolle wurde der Erst-Antikörper weggelassen und nur der Zweit-Antikörper eingesetzt (nicht dargestellt).

### 2.2.15 Fluoreszenzmikroskopie

Wie der Name bereits andeutet, basiert die Fluoreszenzmikroskopie auf dem physikalischen Prinzip der Fluoreszenz, wobei nach Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes (Fluorochrom oder Fluorophor) durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zeitlich kurz versetzt ein Licht anderer Wellenlänge abgestrahlt wird. Nach der Regel der sogenannten Stokes-Verschiebung handelt es sich bei dem abgestrahlten Anteil um ein Licht längerer Wellenlänge als der des eingestrahnten Anteils (daher als Rotverschiebung bezeichnet). Das von der Lichtquelle abgestrahlte Licht muss durch optische Filter geleitet werden, so dass nur eine definierte Wellenlänge zur Anregung der Fluorochrome genutzt wird. Anschließend muss in der Apparatur im selben Strahlengang Anregungs- und Emissionslicht durch einen Farbteiler optisch getrennt werden (sogenannter dichroitischer Spiegel) und das emittierte Licht im Objektiv gesammelt und in das Okular geleitet werden, um von dort auf eine Kamera oder einen elektronischen Verstärker (Photomultiplier) zu gelangen. Das Fluorochrom kann ein Zellbestandteil sein, der von Natur aus fluoresziert (zum Beispiel Chlorophylle), oder es wird von außen ein Fluoreszenzfarbstoff in die Zelle eingebracht und an die zu untersuchenden Proteine gekoppelt. Im vorliegenden Versuch wurde dazu das aus der Qualle *Aequorea victoria* abgeleitete Protein GFP (*green fluorescent protein*) eingesetzt, das gentechnisch mit VAMP fusioniert wurde und auf Anregung mit ultraviolettem Licht grün fluoresziert (Shimomura et al., 1962). Um die zweite Proteinvariante (entsprechend VAMP-1a oder VAMP-1b) in der gleichen Zelle darzustellen, wurde diese an das rote Fluoreszenzprotein RFP gekoppelt, das durch eine andere Wellenlänge spezifisch angeregt wird und rotes Licht ausstrahlt. Eine Überlagerung beider Signale (grün und rot) wird nach Prozessierung der erhaltenen Einzelsignale durch eine gelbe Farbe zur Darstellung gebracht. Bei dem in den vorliegenden

Untersuchungen eingesetzten Fluoreszenzmikroskop handelt es sich um das System Axio Imager.M2 der Firma Carl Zeiss GmbH (Jena). Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mittels der Software *digital high-resolution imaging system AxioCam HRc/AxioVision Rel. 4.8*.

Die Methode der sogenannten TIRF-Mikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*) wird angewendet zur Untersuchung von Strukturen, die sich in der dem Objektträger benachbarten Präparateebene befinden, wie zum Beispiel Vesikel im Bereich der Zellmembran entsprechend der Beschreibungen von Allersma et al. (Allersma et al., 2004). Es wird dazu das Prinzip der Totalen internalen Reflexion genutzt, nach dem in einem bestimmten relativ großen Winkel auf die Grenzfläche eingestrahltes Licht komplett reflektiert statt absorbiert wird (Abbildung 2.4). An der Stelle der Reflexion (Grenzfläche zwischen optisch dichterem und optisch dünnerem Medium) entsteht eine so genannte evaneszente Welle aus elektromagnetischer Strahlung, die eine kurze Strecke (ca. 300 nm) in das Zielvolumen eindringt und sofort stark abgeschwächt wird, so dass nur sehr wenig Licht effektiv zur Anregung eingestrahlt wird. Dadurch wird der Kontrast deutlich besser vor allem in der Nähe des Objektträgers, das heißt, zum Beispiel zur Beobachtung von Exozytosevorgängen an der Zellmembran der auf dem Objektgläschen gewachsenen Zelle. Auch eine zeitliche Auflösung mit sequenzieller Detektion der Strukturen in Echtzeit (*Real-time*-Mikroskopie) wird so besser möglich (Axelrod, 2008). Bei dem genutzten Leica DMI 6000 B handelte es sich um ein inverses Mikroskop, bei dem das zur Anregung genutzte Licht auf der Seite des Objektivs durch Spiegel parallel zur optischen Achse eingekoppelt wird (im Gegensatz zur Prismeneinkopplung) und auch das Emissionslicht durch das Objektiv verläuft. Die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mittels der Software *Leica Application Suite* (LAS AF Version: 2.6.0 build 7266, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim).



**Abbildung 2.4 Schema TIRF-Mikroskopie, modifiziert nach Groves und Kollegen (Groves et al., 2008).** Die Lichtquelle sendet Licht unterschiedlicher Wellenlänge (hier rot, blau und gelb) aus, das durch den Anregungsfilter geleitet wird, so dass nur eine definierte Wellenlänge (hier blau) zur Anregung auf die Zellen im Deckglas gelangt. Ebenfalls in blau dargestellt ist das durch Reflexion des eingestrahlt Lichts entstandene evaneszente Feld. Das Fluoreszenzsignal (Emissionslicht) – hier in grün –, das von Zellproteinen (z.B. GFP) nach Anregung ausgestrahlt wird und mit der Kamera aufgenommen wird, besitzt eine andere Wellenlänge als das eingestrahlt Licht (blau) und kann deswegen den dichroitischen Spiegel passieren, um dann getrennt detektiert zu werden.

### **2.2.16 Proteinextraktion**

Zur Extraktion von Proteinen wurden die Zellen zunächst lysiert, das heißt, mithilfe eines Lysispuffers aufgeschlossen. Das Medium der über Nacht gewachsenen Zelllinien wurde zunächst durch Absaugen entfernt. Um verbliebene Serumbestandteile zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Dann folgte eine Ablösung der Zellen von der Platte mittels Trypsinisierung.

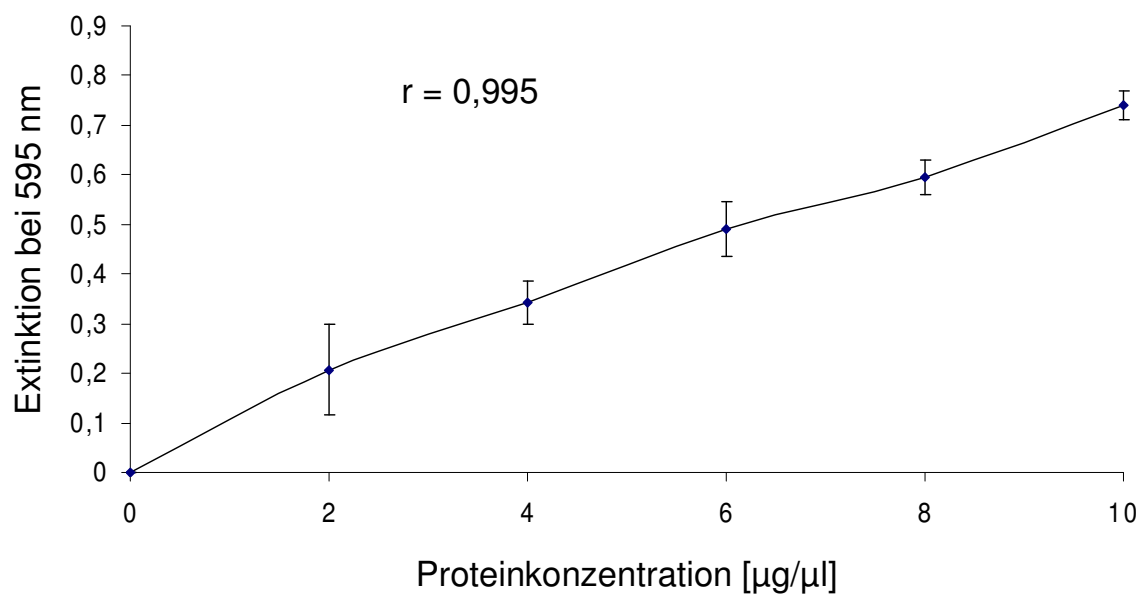
Die zur Lyse vorgesehenen Zellen wurden dann in 3-5 ml DMEM aufgenommen und in ein Falcon-Tube überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 800 U/min wurde der Überstand entfernt und das entstandene Pellet erneut in PBS resuspendiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 800 U/min. Nachdem der Überstand entfernt war, wurden zwei Volumenteile frisch hergestellten und gekühlten Lysispuffers zugegeben und die Mischung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 4°C für 30 min im Drehrad-Rührer inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C und 13.000 U/min für 15 min wurden der proteinhaltige Überstand abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.17 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um definierte Proteinmengen von 5-40 µg pro Tasche im SDS-Gel laden zu können, mussten zunächst die Proteinkonzentrationen des Proteinlysates bestimmt werden. Dies erfolgte entsprechend der Methode von Bradford (Bradford, 1976), die darauf beruht, dass das sogenannte Bradford-Reagenz (saure Lösung aus Coomassie-Brilliant-Blau G250) mit Proteinen in einer Mischung reagiert. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des eingestrahltten Lichtes von 465 nm zu 595 nm, so dass die Extinktionszunahme annähernd proportional zur Proteinkonzentration ist.

Da absolute Proteinkonzentrationen benötigt wurden, musste zunächst eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen an Rinderalbumin (BSA) in fünf Verdünnungen erstellt werden (Abbildung 2.5).

	Leerwert	Standard 1:2	Standard 1:4	Standard 1:6	Standard 1:8	Standard 1:10	Probe
Lysispuffer	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	-
BSA	-	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl	-
Proteinextrakt	-	-	-	-	-	-	3 µl



**Abbildung 2.5 Proteinstandardkurve.** Zur Erstellung einer Proteineichkurve wurde Rinderalbumin (BSA, bovines Serumalbumin) wie oben dargestellt in fünf verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und die Extinktion mittels der Methode nach Bradford gemessen.  $r$ =Korrelationskoeffizient

Die Proteinproben wurden in Doppel- oder Dreifachmessung à 3 µl mit je 1 ml Bradford-Lösung (1:5-verdünnte Stammlösung) versetzt und mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Durchmischen wurden sie in eine Einmal-Halbmikroküvette überführt und darin gegen einen Leerwert (3 µl Lysispuffer statt Probe) bei 595 nm mit einem Photometer gemessen.

### 2.2.18 Messung der DNA-Konzentration

Ähnlich wie die Proteinkonzentration können auch DNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt werden. Hierbei wird die Konzentration in einer Quarzküvette bei 260 nm gegen einen Leerwert (z.B. 100 µl ddH<sub>2</sub>O) gemessen. Man setzt dazu eine verdünnte Menge der DNA-Lösung ein (z.B. 2,5 µl in 100 µl H<sub>2</sub>O = 1:40).

### 2.2.19 Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen zum anschließenden Sichtbarmachen durch Markierung mittels Antikörper erfolgte entsprechend der Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970). Damit die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld bei der Elektrophorese nur abhängig vom Molekulargewicht (genauer: von der Molekülgröße) der Proteine ist, müssen sie zunächst entfaltet werden und die vorhandenen Ladungsunterschiede ausgeglichen werden, so dass die Tertiärstruktur und die damit einhergehende Ladungsverteilung keinen Einfluss auf die Laufeigenschaften hat. Bei der Probenvorbereitung wird daher, neben einer Erhitzung der Proben, SDS (Natriumdodecylsulfat) dazu benutzt, zum Einen die Proteine durch nichtkovalente Wechselwirkung mit hydrophoben Bereichen zu denaturieren und zum Anderen entsprechend ihres Aminosäuregehaltes mit negativen Ladungen zu versehen. Erst damit sind die Voraussetzungen dafür gegeben, dass die Proteine in einem Polyacrylamid-Gel abhängig vom Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Die Porengröße der Gelmatrix, die wie ein Sieb wirkt, bestimmt dabei, in welcher Auflösung die Proteine aufgetrennt werden.

Es handelt sich bei dem eingesetzten Gel um ein sogenanntes diskontinuierliches System, bestehend aus einem Sammelgel, in dem alle Proteine zunächst in einer Bande gesammelt werden, und einem Trenngel, in welchem die Proteine anschließend aufgetrennt werden. Hier wurde ein Trenngel von 15%-iger Konzentration des Polyacrylamids gewählt, da hier Moleküle von ca. 17 kDa wie VAMP-1 die größte Auflösung erfahren. Für die größtmögliche Auflösung der Fluoreszenz-Konstrukte (im Bereich von ca. 40 kDa) wurde hingegen ein Trenngel von 12% genutzt.



Für vier SDS-Polyacrylamid-Gele wurden pipettiert:

	<b>Trenngel 15% (Volumen 40 ml)</b>	<b>Trenngel 12% (Volumen 40 ml)</b>	<b>Sammelgel (Volumen 20 ml)</b>
ddH <sub>2</sub> O	8,6 ml	12,8 ml	10,8 ml
Acrylamid-Stammlösung	20,6 ml	16,4 ml	4 ml
1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)	10 ml	10 ml	0 ml
0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)	0 ml	0 ml	5 ml
10% SDS	0,4 ml	0,4 ml	0,2 ml
APS	0,4 ml	0,4 ml	0,2 ml
TEMED	40 µl	40 µl	20 µl

Zunächst wurde die Gelapparatur vorbereitet, indem die gereinigten Glasplatten inklusive *Spacer* mittels einer Klammer fixiert und mit einer Gummidichtung nach unten abgedichtet auf die Apparatur gesetzt wurden. Nach Start der Polymerisation bei Zugabe von TEMED wurde der obige Gelansatz nach kurzem Durchmischen in die Gelapparatur gegossen und anschließend mit einer kleinen Menge Isopropanol überschichtet, um die Oberfläche zu glätten und abzuschließen, solange die Polymerisation noch nicht beendet war. Nach Abgießen des Isopropanols konnte das nach obiger Vorschrift gemischte Sammelgel auf das feste Trenngel in die Apparatur gegossen werden und unter Vermeidung von Luftblasen ein Kamm hinein gesetzt werden.

Bei abgeschlossener Polymerisation wurde das Gel in den Glasplatten in eine Elektrophoresekammer überführt und mit SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Nach vorsichtiger Entfernung des Kamms wurden 5 µl eines Proteinstandards verwendet und in die restlichen Geltaschen die vorbereiteten Proben mittels einer Hamilton-Pipette eingefüllt.

Die Elektrophorese fand bei zunächst 80 V zum Durchlaufen des Sammelgels (~ 15 min) und anschließend 100 V für das Trenngel statt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für die Western Blot-Analyse eingesetzt.

### 2.2.20 Western Blot-Analyse

Um unter den auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteinen diejenigen von Interesse analysieren zu können, mussten die enthaltenen Proteine zunächst auf eine Nitrocellulose-Membran gleicher Größe transferiert werden, wo sie

anschließend einer Analyse, beispielsweise anhand einer immunologischen Nachweisreaktion mittels Antikörper, zugänglich waren.

Bei dem entsprechenden Verfahren nach Towbin (Towbin et al., 1979), hier in Form eines sogenannten *tankblot*, musste das Gel in unmittelbarer Nähe zu dieser Membran in eine Blotkammer eingebracht werden, wo die Proteine durch ein transversal zur Geloberfläche angelegtes Spannungsfeld an der anodischen Seite austreten und auf die Membran übergehen. Die Proteine bilden dabei das gleiche Muster auf der Membran, das bei der elektrophoretischen Auftrennung im Gel entstanden ist.

Hierzu wurden zunächst alle Elemente des *Blot-Sandwiches* in Transferpuffer äquilibriert. Beginnend an der kathodischen Seite wurden das Gel und die Membran dann in folgender Weise in der Kassette geschichtet: Ein Schaumstoffstück wurde mit einem auf die Größe des Gels zugeschnittenen Whatman-Filterpapier belegt. Es folgte darauf das Gel, die zugeschnittene Nitrocellulose-Membran, ein weiteres Filterpapier von passender Größe, sowie als letztes ein weiteres Schaumstoffkissen. Entstandene Luftblasen zwischen Gel und Membran wurden bestmöglich entfernt. Zusammen mit einem Kühlelement und einem Rührfisch wurde die so geschichtete Kassette in den Blottank überführt, mit Transferpuffer umgeben und für 1 h bei konstanten 100 V im 4 °C-Kühlraum belassen. Die geblotteten Membranen konnten, nachdem sie aus dem Blottank entfernt wurden zugeschnitten und beschriftet werden.

### **2.2.21 Nachweis von Proteinbanden mittels Chemilumineszenz**

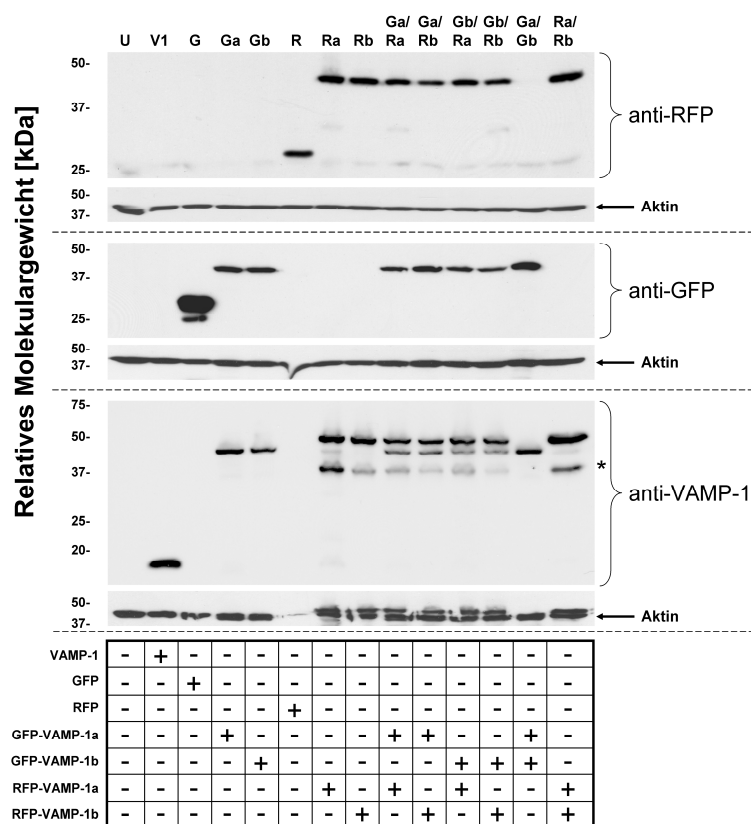
Die nun auf der Membran befindlichen Proteine konnten jetzt durch eine immunologische Reaktion sichtbar gemacht werden, indem ein Erstantikörper, der spezifisch an das nachzuweisende Protein auf der Membran bindet, durch einen mit dem Erstantikörper reagierenden Zweitantikörper markiert wird. Dazu ist das Enzym Merretichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) an den IgG-Zweitantikörper gekoppelt, das bei Inkubation mit einer Chemilumineszenzlösung durch eine enzymatische Reaktion Licht produziert (*Enhanced Chemoluminescence*, ECL). Dieses Licht wird mithilfe eines Films detektiert, so dass nach der Entwicklung des Films eine Schwärzung in Form einer Bande am Bindungsort des Erstantikörpers zu sehen ist.

Um eine Bindung von den eingesetzten spezifischen Antikörpern an unspezifische Bindungsstellen von sämtlichen weiteren Proteinen auf der Membran zu verhindern und damit das entstehende Hintergrundsignal zu minimieren, musste die Membran zunächst für eine Stunde mit einem Magermilch-haltigen Puffer (*blocking buffer*) geblockt werden, durch den diese Bindungsstellen besetzt werden. Anschließend wurden drei Mal eine fünfminütige Waschung der Membran mit TBS/T durchgeführt. Nun wurde der primäre Antikörper, der sich gegen ein spezifisches Protein richtet, in der Primärantikörper-Verdünnungslösung in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung (z.B. anti-VAMP-1 von abcam 1:3000) über Nacht bei 4°C unter Schwenken auf dem Schüttler mit der Membran zur Bindung gebracht. Die Membran wurde dann durch weitere drei Waschschriffe (TBS/T) von überschüssigem nicht gebundenen Antikörper befreit. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:2000) erfolgte für 1 h im *blocking buffer*. Es wurde die Membran anschließend wieder dreimal für fünf Minuten in TBS/T gewaschen, das dann abgegossen wurde. Für die enzymatische Reaktion wurde eine Chemilumineszenzlösung der Firma Thermo Scientific eingesetzt, wobei eine 1:1-Mischung der gelieferten Lösungen A (Luminol-Lösung) und B (Peroxid-Lösung) hergestellt wurde. 1 ml des Gemisches wurde für eine einzelne Membran eingesetzt, dort möglichst gleichmäßig verteilt und für 1 Minute belassen. Diese wurde dann sofort in eine Filmkassette eingelegt, wobei unter der Schutzfolie bestmöglich vorhandene Luftblasen entfernt wurden wonach die Filmexposition erfolgte. Je nach Stärke des Signals erfolgte eine Exposition für einige Sekunden bis zu mehreren Stunden. Anschließend erfolgte die automatische Entwicklung des Films mittels einer Entwicklermaschine (Optimax).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Validierung der Expression von GFP- und RFP-VAMP-1a und -1b Konstrukten

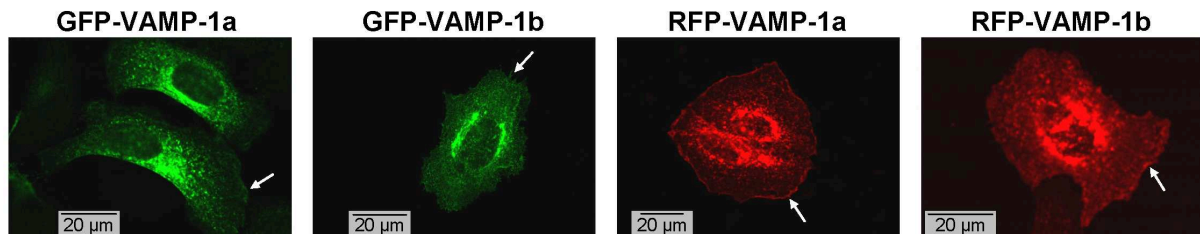
Die rekombinanten GFP- bzw. RFP-VAMP-1a und -1b Konstrukte wurden in COS-7 Zellen transfiziert und deren Expression mittels Westernblot-Analyse beurteilt. In allen Fällen konnte ein entsprechendes GFP- bzw. RFP-VAMP-1 Fusionsprotein passender Größe nachgewiesen werden (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1 Expression der GFP- und RFP-VAMP-1a und -1b Konstrukte.**

In Western blot-Analysen der Lysate von COS-7 Zellen nach Transfektion zeigen sich Proteinbanden passender Größe bei Einsatz von RFP- bzw. GFP-spezifischen Antikörpern. Die gleichen Proteinbanden können nach Inkubation mit einem VAMP-1 spezifischen Antikörper dargestellt werden. Hier findet sich am ehesten in Zusammenhang mit Transfektion bzw. Kotretransfektion eines RFP-VAMP-1 Konstruktes eine Bande geringerer Größe und variabler Intensität (\*), die jedoch keine Antigenität gegen RFP- bzw. GFP-Antikörper aufweist und vermutlich Abspaltungsprodukte der RFP-Fusionsproteine darstellt. Eine Bande, konsistent mit VAMP-1 (ca. 17 kDa), stellt sich nach Transfektion von COS-7 mit einem VAMP-1 Expressionsvektor dar. (U=untransfiziert, V1=VAMP-1, G=GFP, Ga=GFP-VAMP-1a, Gb=GFP-VAMP-1b, Ra=RFP-VAMP-1a, Rb=RFP-VAMP-1b)

Nach Transfektion der entsprechenden Konstrukte in HeLa-Zellen zeigt sich fluoreszenzmikroskopisch ein deutliches GFP- bzw. RFP-Signal aller vier VAMP-Fusionsproteine (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2 Einzelexpression der GFP- und RFP-VAMP-1 Fusionsproteine.** Nach Transfektion in HeLa-Zellen zeigt sich eine deutliche Expression der GFP-VAMP-1a/b (grün) und RFP-VAMP-1a/b (rot) Proteine. Alle vier Fusionsproteine zeigen eine bevorzugt zytoplasmatische vesikuläre Lokalisation sowie teilweise auch Lokalisation im Bereich der Plasmamembran (Pfeile).

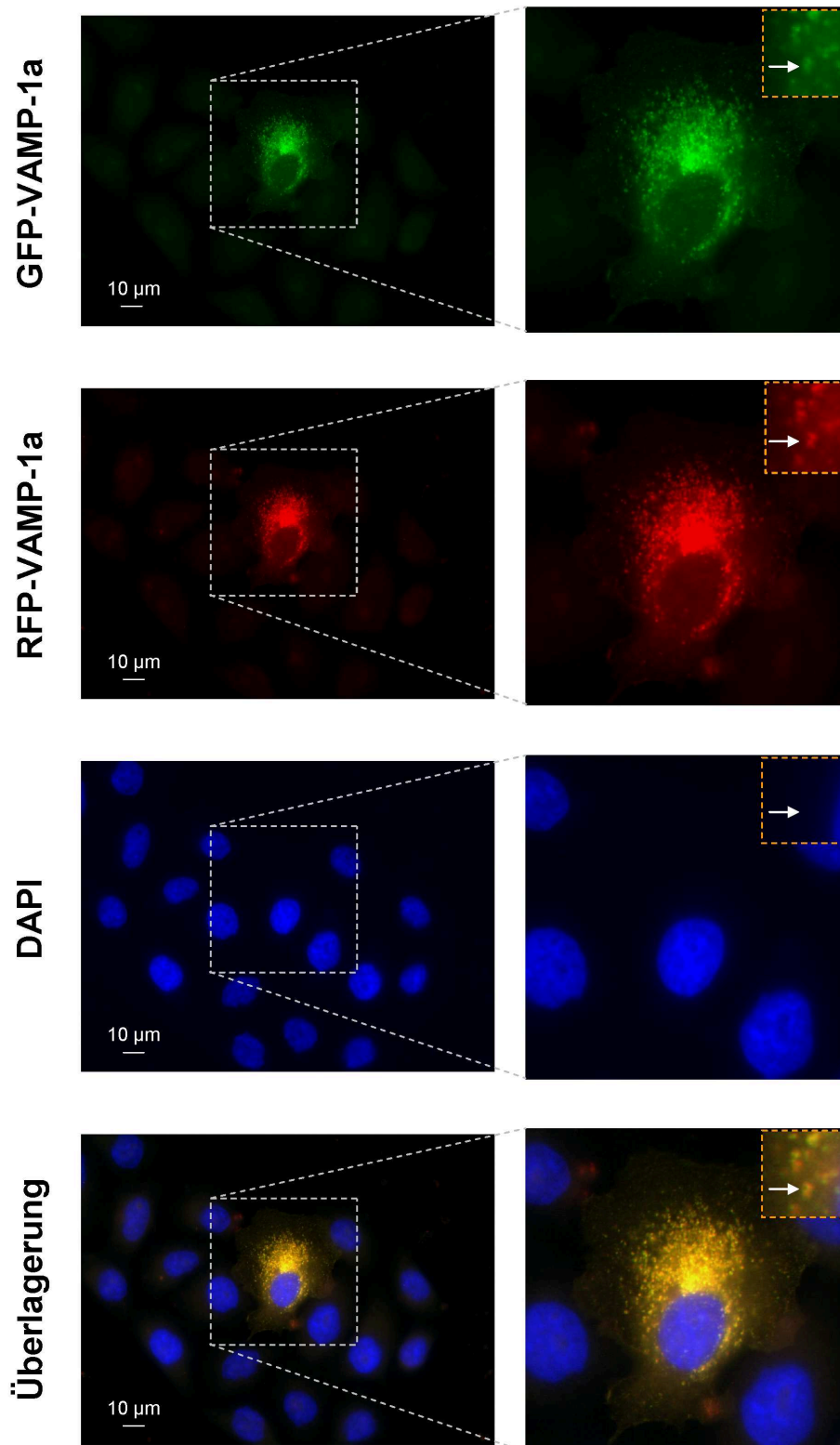
### **3.2 Hinweise auf mögliche Unterschiede in der subzellulären Lokalisation beider VAMP-1 Isoformen**

#### **3.2.1 Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1a**

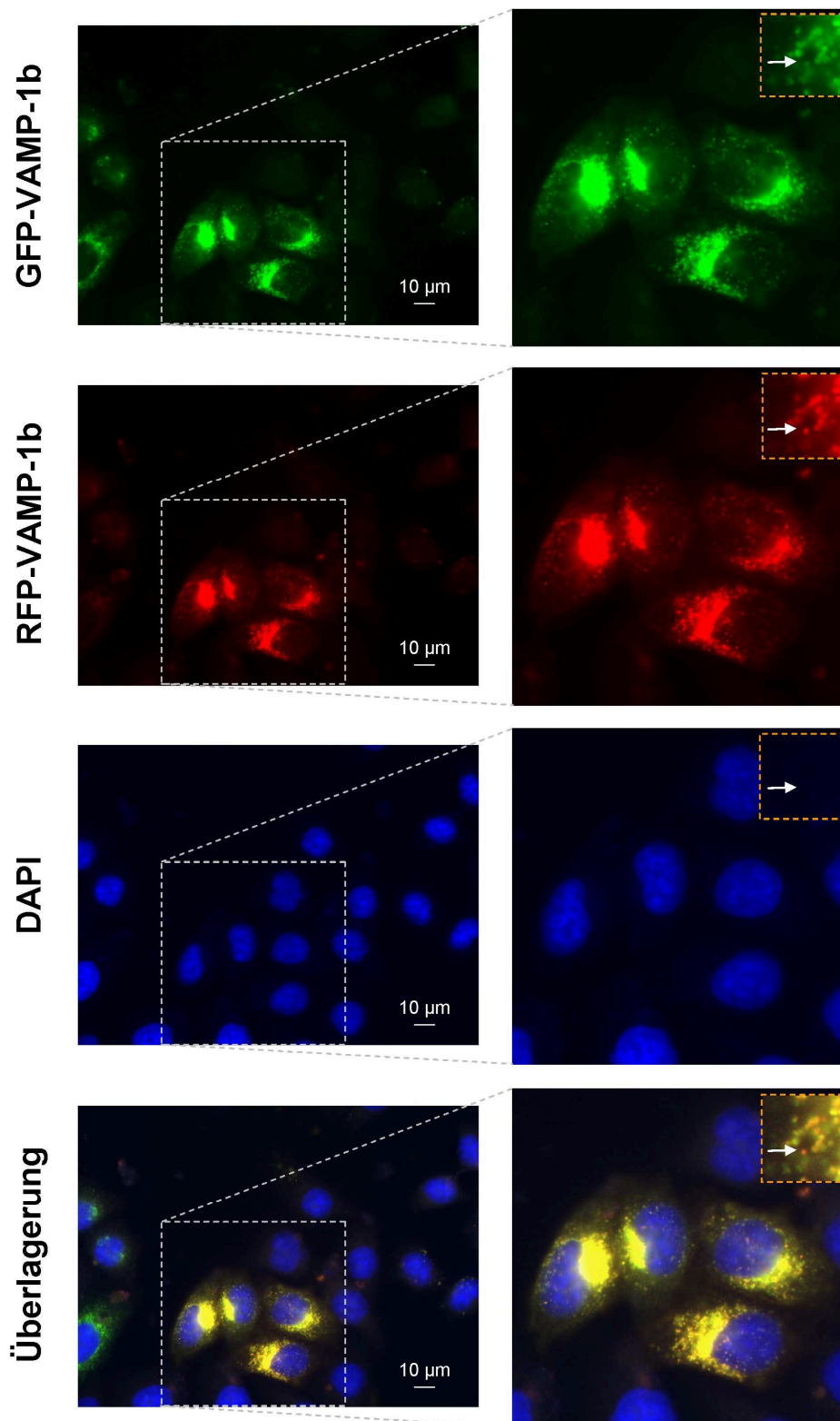
Um zunächst zu untersuchen, ob GFP- und RFP-markierte VAMP-1a-Fusionsproteine eine vergleichbare subzelluläre Lokalisation aufweisen, erfolgte eine Kotransfektion beider Konstrukte (GFP-VAMP-1a/RFP-VAMP-1a) in HeLa-Zellen. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, zeigt sich erwartungsgemäß eine weitgehende Kolokalisation beider Proteine (gelbes Signal, Überlagerung). In der Peripherie der Zelle finden sich jedoch auch getrennte, benachbart gelegene rote und grüne Signale. Bei Vergrößerung fällt hierbei allerdings auf, dass die jeweiligen Signale (rot/gelb/grün) von gleichen vesikulären Strukturen abzustammen scheinen (Abbildung 3.3, weiße Pfeile). Aus diesem Grunde sollte eine Beurteilung der Kolokalisation der VAMP-1 Isoformen sich im Weiteren nicht ausschließlich auf den Nachweis eines gelben Signals bei Überlappung der grünen und roten Fluoreszenz stützen, sondern ebenfalls mit berücksichtigen, ob die nachgewiesenen Signale von gleichen oder verschiedenen Strukturen herrühren.

#### **3.2.2 Kotransfektion von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1b**

In gleicher Weise wie nach Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1a, zeigt sich auch bei der entsprechenden Kotransfektion der GFP-VAMP-1b- und RFP-VAMP-1b Expressionsvektoren in HeLa-Zellen eine weitgehende Kolokalisation beider Fusionsproteine. Auch hierbei finden sich bei Überlagerung der Signale (Abbildung 3.4), insbesondere in peripheren Bereichen der Zelle, vesikuläre Strukturen, die überwiegend eine rote bzw. grüne Fluoreszenz aufweisen, die jedoch auch hier von gleichen Strukturen herzurühren scheinen.



**Abbildung 3.3 Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1a in HeLa-Zellen.** Nach Kotransfektion der GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1a Konstrukte zeigt sich eine weitgehende Kolokalisation (gelb) beider Fusionsproteine. Getrennt wirkende grüne und rote Signale scheinen von gleichen vesikulären Strukturen herzurühren (Pfeil). (Beurteilt wurden Zellen, die beide Proteine koexprimieren).



**Abbildung 3.4 Kotransfektion von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1b in HeLa-Zellen.** Nach Kotransfektion der GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1b Konstrukte zeigt sich eine weitgehende Kolokalisation (gelb) beider Fusionsproteine. Eine bei Überlagerung rot erscheinende vesikuläre Struktur weist auch eine grüne Fluoreszenz auf, die im grünen Kanal (GFP) deutlich wird (Pfeil). (Beurteilt wurden Zellen, die beide Proteine koexprimieren).

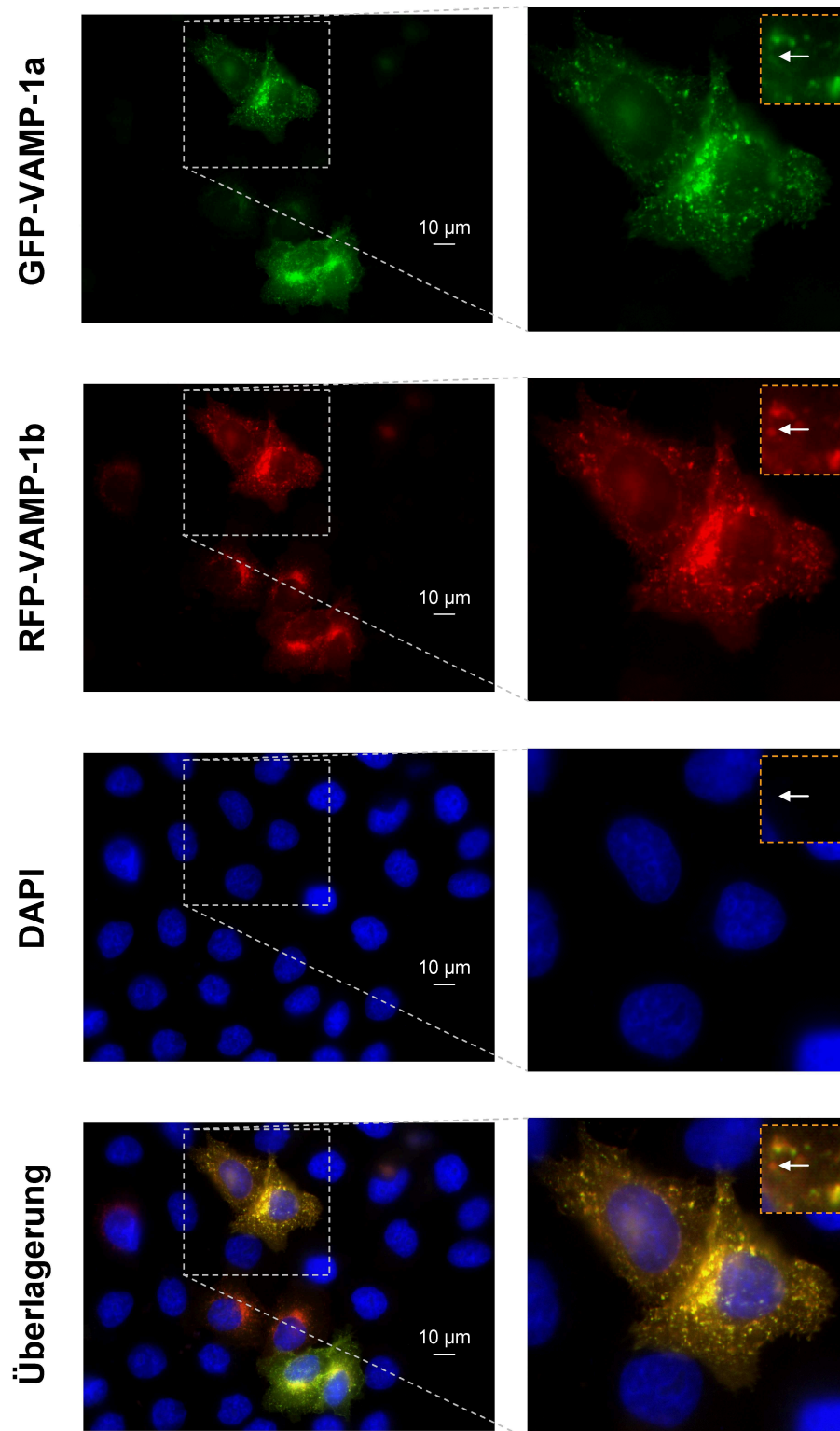


### 3.2.3 Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1b

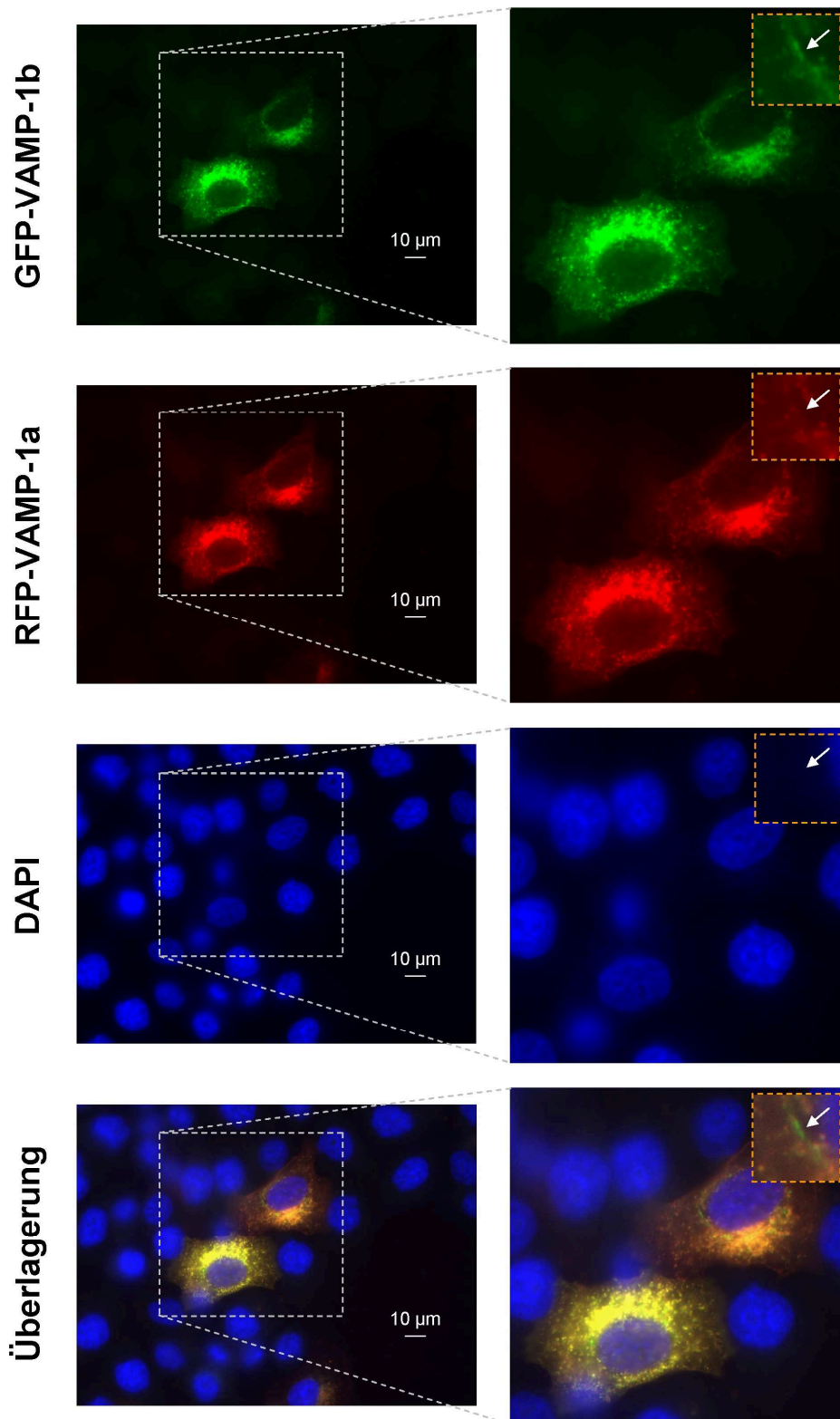
Nach Kotransfektion des GFP-VAMP-1a mit dem RFP-VAMP-1b Expressionskonstrukt sieht man betont in perinukleären Bereichen eine Kolokalisation (Abbildung 3.5). Wie zuvor bereits beobachtet, stellen sich vorwiegend vesikuläre fluoreszierende Strukturen unter wesentlicher Aussparung des Zellkerns dar. In der Vergrößerung ist eine vesikuläre Struktur hervorgehoben, die vorwiegend im roten Kanal darstellbar ist (Pfeil). Die Existenz einer Vesikelpopulation, die jeweils nur eine der beiden VAMP-Isoformen enthält, erscheint daher möglich, kann jedoch aufgrund einer weitläufigen Kolokalisation beider Isoformen nicht zweifelsfrei geklärt werden.

### 3.2.4 Kotransfektion von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1a

In gleicher Weise wie in Abbildung 3.5 dargestellt, wurden zum Vergleich die entsprechenden GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1a Konstrukte in HeLa-Zellen transfiziert. Wie für beide VAMP-Isoformen zu erwarten, zeigt sich eine überwiegende Kolokalisation beider Proteine. Es lassen sich jedoch auch Strukturen nachweisen, in denen überwiegend eine der Isoformen exprimiert ist (Abbildung 3.6, weißer Pfeil). Insgesamt weisen die Beobachtungen auf das mögliche Vorkommen subzellulärer Strukturen hin, die bevorzugt nur eine der beiden VAMP-1 Isoformen exprimieren. Es lässt sich jedoch auch hier keine abschliessende Aussage treffen bezüglich des Vorkommens von Vesikelpopulationen, die nur eine der beiden Isoformen aufweisen.



**Abbildung 3.5 Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1b in HeLa-Zellen.** Wie erwartet zeigt sich eine deutliche Überlappung der Signale (gelb). In peripheren Bereichen finden sich auch vereinzelte vesikuläre Strukturen, die nur eine der beiden Isoformen aufzuweisen scheinen (Pfeil). (Beurteilt wurden Zellen, die beide Proteine koexprimieren).



**Abbildung 3.6 Kotransfektion von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1a in HeLa-Zellen.** Vergleichbar mit den in Abbildung 3.5 gemachten Beobachtungen, sieht man eine überwiegende Kolokalisation von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1a, wobei sich auch hier Bereiche darstellen lassen, welche vorwiegend nur eine Isoform aufweisen (Pfeil). (Beurteilt wurden Zellen, die beide Proteine koexprimieren).

### **3.3 Beobachtung von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1b exprimierenden Vesikeln mittels TIRF-Mikroskopie**

#### **3.3.1 Intrazelluläre Vesikel zeigen variable Bewegungsmuster.**

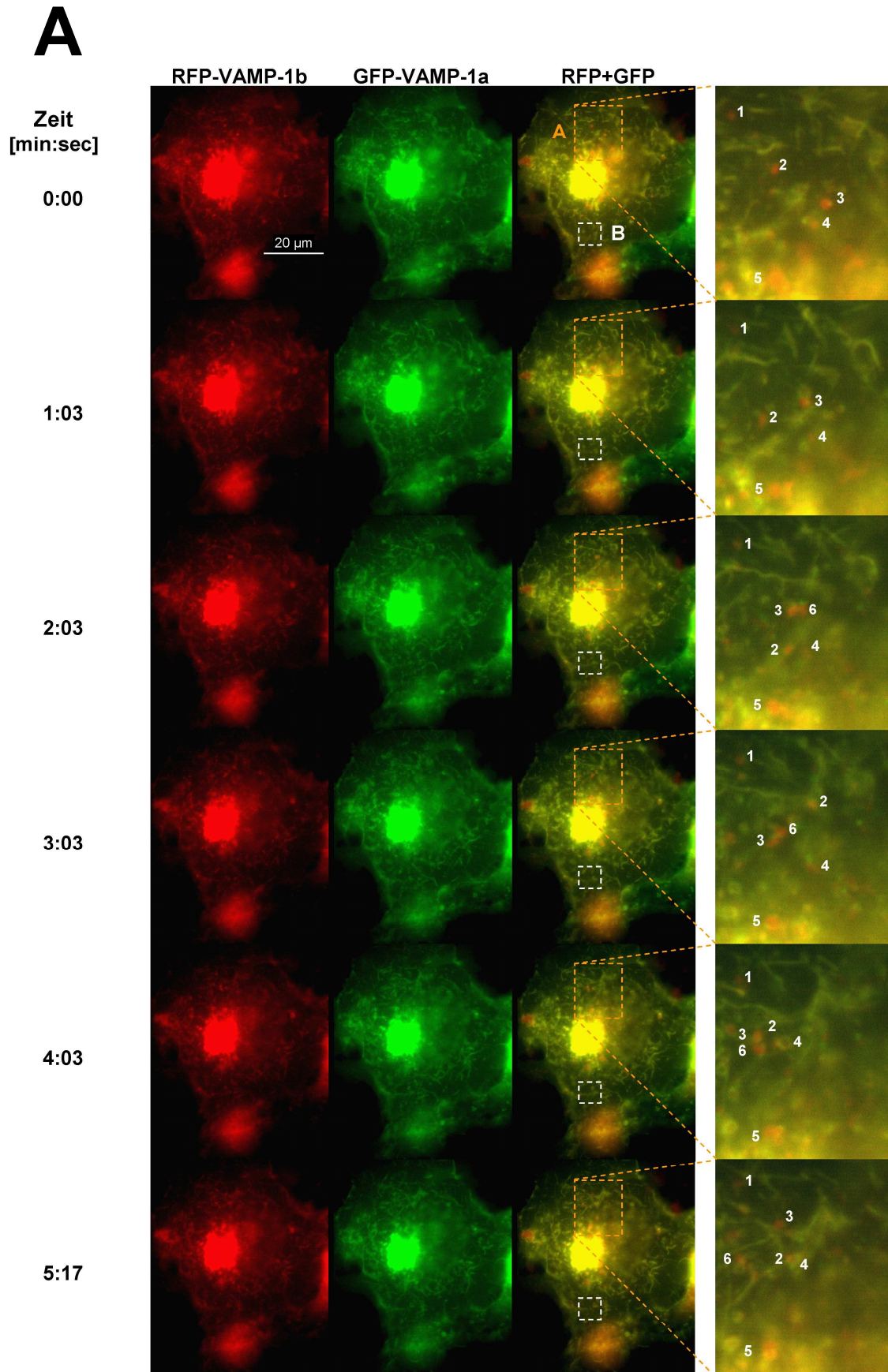
In kotransfizierten COS-7 Zellen stellt sich in der TIRF-Mikroskopie (Abbildung 3.7A) eine breite Verteilung der exprimierten Konstrukte insbesondere im zentralen, perinukleären Bereich dar. Hierbei sind unterschiedlich große GFP-VAMP-1a- bzw. RFP-VAMP-1b- positive Strukturen abgrenzbar. Es lassen sich Vesikel nachweisen, die beide Isoformen parallel enthalten oder auch solche, die nur bzw. vorwiegend eine der Isoformen (nur rote bzw. grüne Fluoreszenz) aufweisen. Wie in Abbildung 3.7B aufgeführt, zeigen einzelne Vesikel sehr unterschiedliche Bewegungsmuster. Einige der Vesikel (2,3,4,6) legen zum Teil längere Strecken zurück und ändern ihre Bewegungsrichtung mehrmals, wohingegen andere Vesikel (1,5) nahezu stationär verharren. Hier scheint sich sogar eine Art „Zentrum“ abzubilden, in welchem sich die Vesikel (2,3,4,6) bevorzugt bewegen und anordnen, wobei immer wieder kurze Annäherungen der Vesikel aneinander mit scheinbarem Kontakt stattfinden (insbesondere zwischen Vesikeln 3 und 6) (siehe Aufnahmen 2min:03sec und 3min:03sec in Abbildung 3.7A).

#### **3.3.2 Hinweise auf Vesikelkontakte GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1b exprimierender Vesikel ohne und mit anschließender Fusion**

In Abbildung 3.8 (gleicher Bereich wie Bildausschnitt A in Abbildung 3.7) ist die Bewegung zweier Vesikel dargestellt. Das rundlichere Vesikel 1, welches eine überwiegend grüne Fluoreszenz aufweist (entsprechend VAMP-1a), das sich durch sein erkennbares Lumen von Vesikel 2 abgrenzt, bleibt in seiner Position überwiegend stationär. Im Gegensatz hierzu zeigt das etwas kleinere Vesikel 2, welches eine vorwiegend rote Fluoreszenz (entsprechend VAMP-1b) aufweist, im Vergleich zu Vesikel 1 eine deutlich höhere Motilität. Die rechts an Vesikel 2 gelegene grüne Struktur im ersten Bild der Serie (0min:38sec) löst sich in der Folge (0min:45sec) wieder von Vesikel 2 und gehört daher vermutlich zu einem separaten Vesikel. Wie im weiteren Verlauf zu sehen, wechselt vor allem Vesikel 2 seine Position und bewegt sich auf Vesikel 1 zu. Im fünften Bild (1min:21sec) kommt es zu einem engen Kontakt beider Vesikel (weißer Pfeil). Da trotz der räumlichen Nähe beider Vesikel ihre Form und Größe unverändert erscheint, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest eine komplette Fusion beider Vesikel

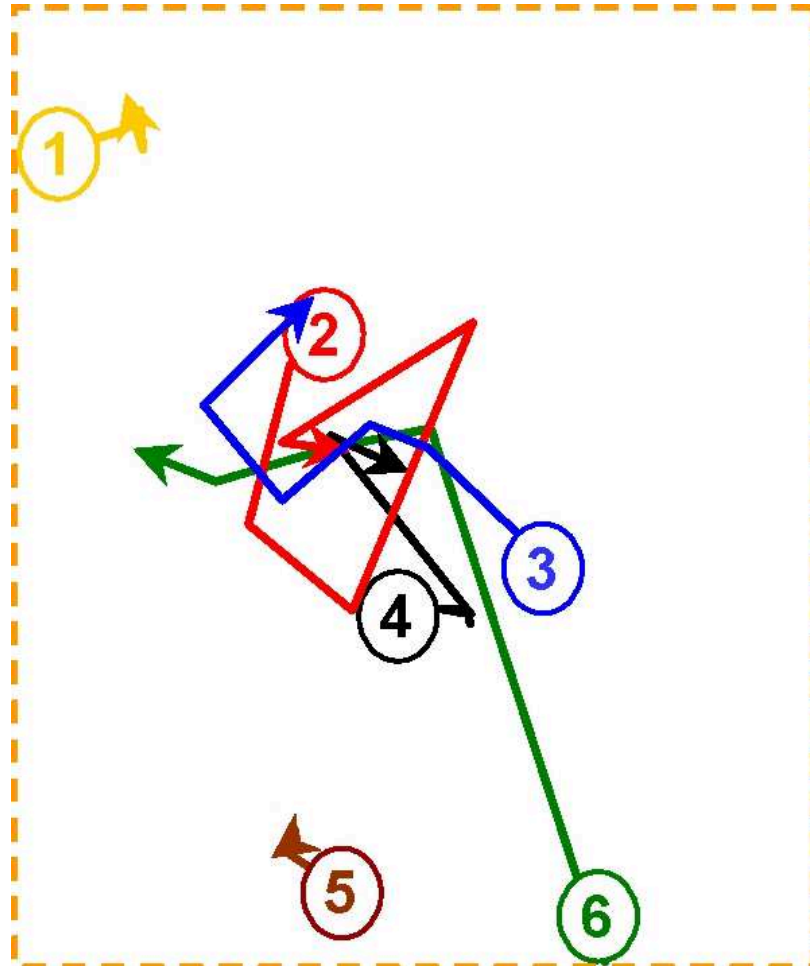
miteinander sowie Vermischung der VAMP-Isoformen ausgeblieben ist. Diese Beobachtung ist vereinbar mit dem sogenannten *kiss-and-run* Mechanismus, wie er auch zum Austausch des Vesikelinhalts endosomaler Kompartimente untereinander oder bei der partiellen Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran zu beobachten ist (siehe Diskussion Kapitel 4.4 und 4.5).

Hingegen zeigen sich in der Abbildung 3.9 (gleicher Bereich wie Bildausschnitt B in Abbildung 3.7 A) zwei Vesikel, die ein anderes Verhalten zeigen. Es handelt sich hier um Vesikel, bei welchen ein Lumen erkennbar ist und die jeweils beide VAMP-1 Isoformen exprimieren. Auch hier erscheint eines von beiden Vesikeln (2) stationär, wohingegen das andere Vesikel (1) sich auf Vesikel 2 zubewegt. Im vorliegenden Fall stellt sich eine vollständige Verschmelzung beider Vesikelmembranen dar (Bild 6, 4min:45sec). Das resultierende Fusionsvesikel erscheint größer, jedoch mit vergleichbarer Fluoreszenzintensität wie die ursprünglichen Vesikel 1 und 2.

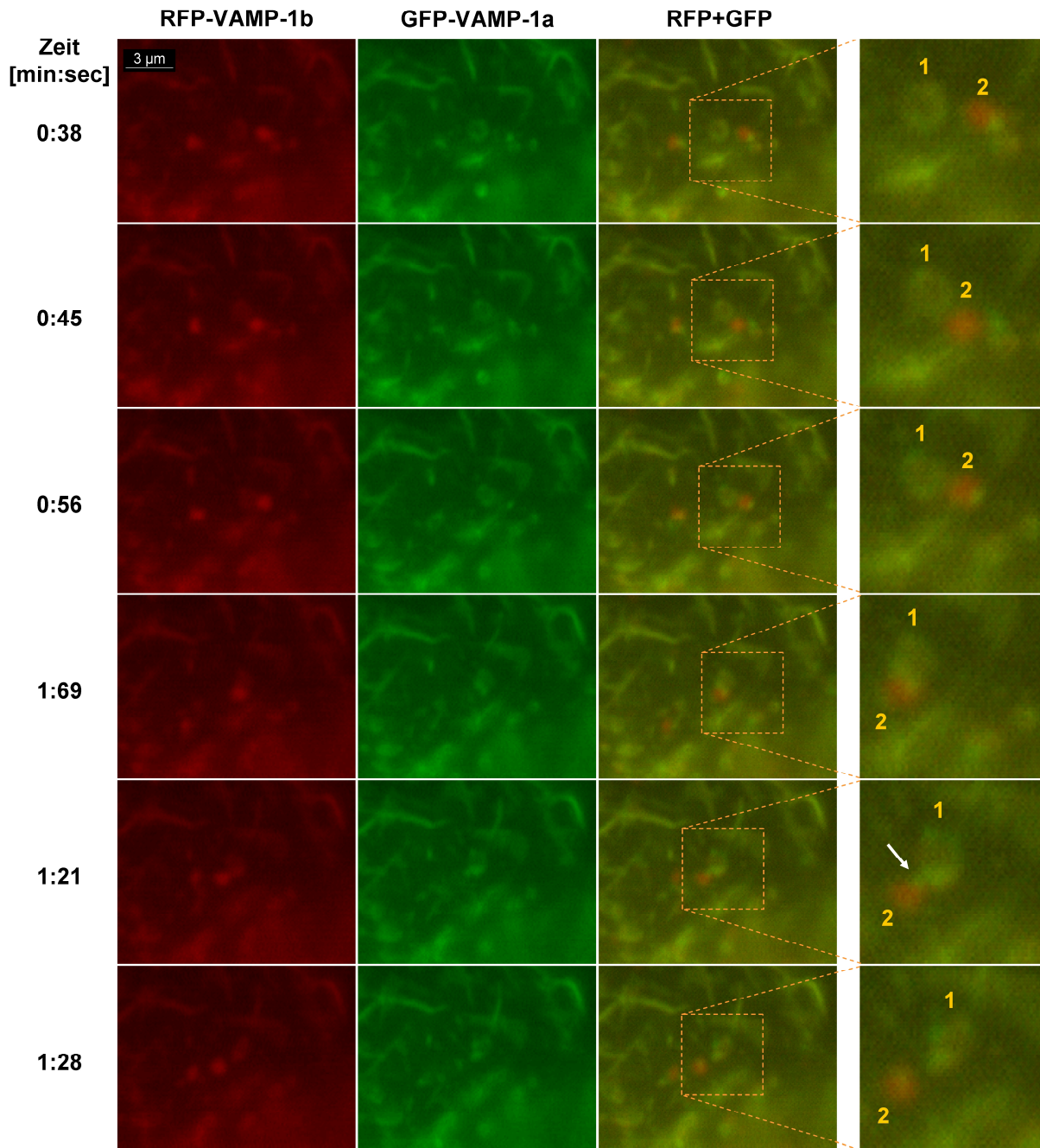




## B

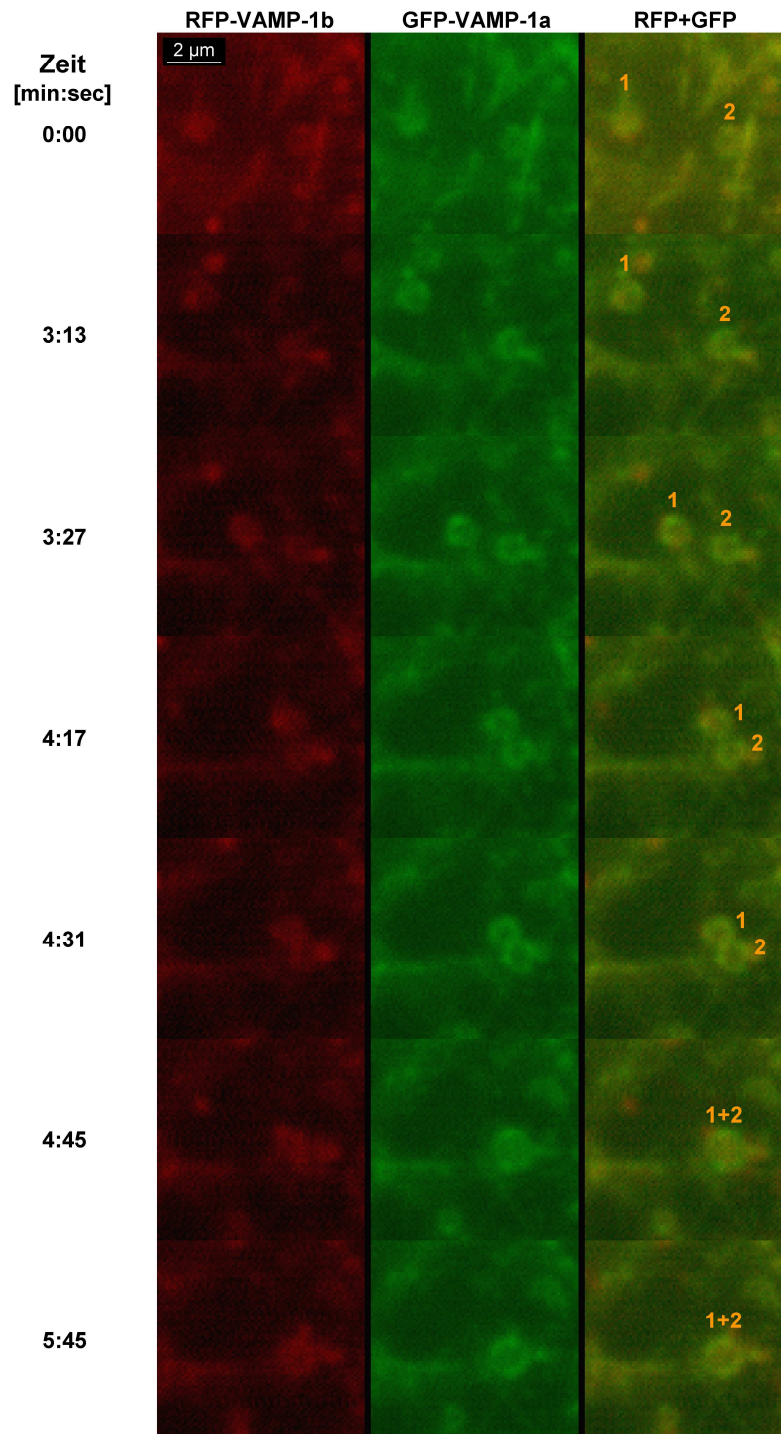


**Abbildung 3.7 Darstellung von RFP- und GFP- positiven Vesikeln mittels TIRF-Mikroskopie.** (A) In der Übersichtsvergrößerung erkennt man in weiten Teilen überlappende Signale (gelb) der Isoformen VAMP-1a und VAMP-1b mit einem Schwerpunkt juxtanukleär im Zentrum der erfassten Zelle. In der Ausschnittsvergrößerung A lassen sich mehrere Vesikel abgrenzen, die vorwiegend eine grüne oder rote Fluoreszenz aufweisen und eine variable Beweglichkeit zeigen (1-6). (B) Schematisch dargestellt ist der Weg, den die einzelnen Vesikel (1 bis 6) innerhalb des erfassten Zeitraums zurücklegen. Hierbei zeigen sich deutliche Unterschiede in der Motilität der verschiedenen Vesikel.



**Abbildung 3.8 Hinweise auf Vesikelkontakt ohne Fusion.** Der vergrößerte Ausschnitt entspricht dem in der Abbildung 3.7A orange hervorgehobenen Bereich A, wobei hier ein kürzerer Zeitraum betrachtet wurde (0min:38sec - 1min:28sec). Die gewählte Sequenz lässt die Beziehung einzelner Vesikel zueinander erkennen, die in der Vergrößerung rechts mit 1 und 2 gekennzeichnet sind. Im fünften Bild nähern sich diese zwei Vesikel aneinander an, ohne zu verschmelzen (Pfeil).





**Abbildung 3.9 Hinweise auf Fusion GFP-VAMP-1a- und RFP-VAMP-1b-exprimierender Vesikel.** Der vergrößerte Ausschnitt entspricht dem in der Abbildung 3.7A weiß umrandeten Bereich B. In der Abbildung sind zwei ähnlich konfigurierte Vesikel dargestellt (bezeichnet mit 1 und 2), die sowohl eine RFP- als auch GFP-Fluoreszenz erkennen lassen und damit beide Isoformen (VAMP-1a und -1b) enthalten. Im Verlauf lässt sich eine Annäherung der Vesikel aneinander erkennen, bis schließlich bei 4min:45sec eine Fusion beider Vesikel stattfindet, aus welcher ein größeres einzelnes Vesikel hervorgeht (1+2).

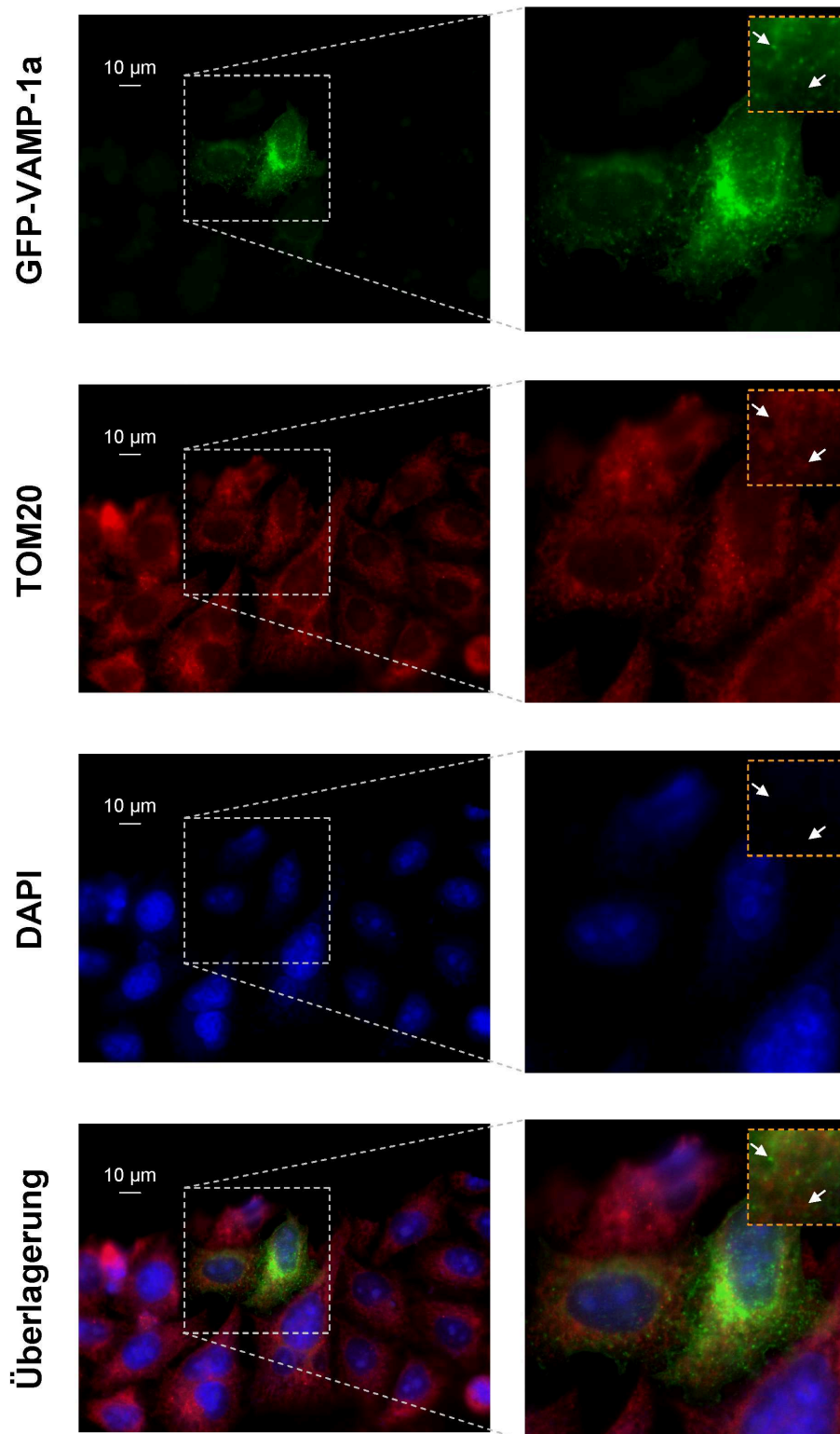
### **3.4 Untersuchungen zur Koloalisation von VAMP-1a und VAMP-1b mit Markerproteinen verschiedener Zellkompartimente**

#### **3.4.1 VAMP-1a und -1b zeigen keine Sortierung zu Mitochondrien.**

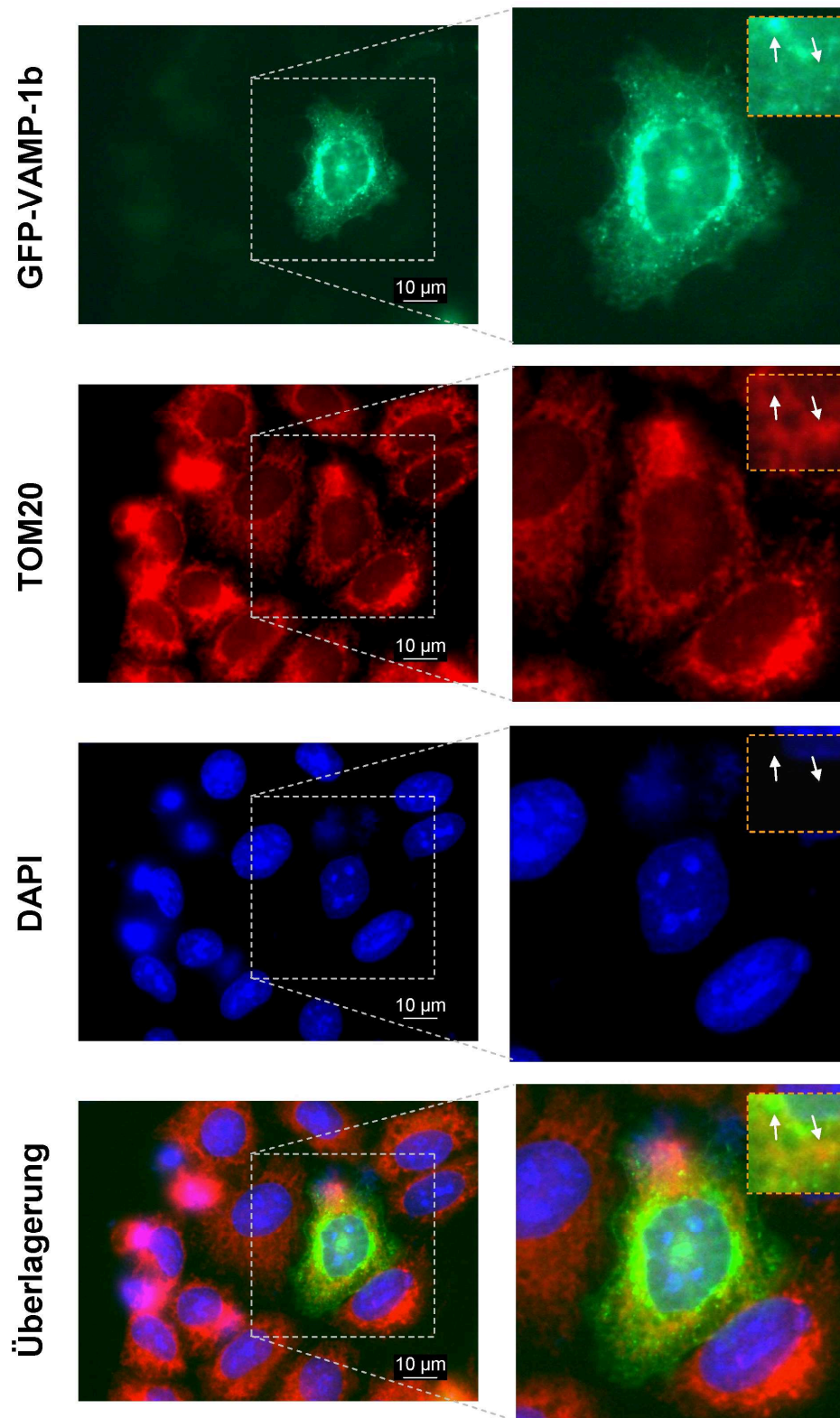
Wie zuvor berichtet wurde (Isenmann et al., 1998), existieren VAMP-1 Isoformen, welche zu Mitochondrien sortieren können. Um zu überprüfen, ob VAMP-1a und VAMP-1b bzw. die entsprechenden GFP-Fusionsproteine eine mitochondriale Sortierung aufweisen, erfolgte nach Transfektion der Zellen mit GFP-VAMP-1a oder -1b anschließend eine immunzytochemische Färbung mit dem Mitochondrienmarker TOM20, einem Protein der äußeren Mitochondrienmembran. In Abbildung 3.10 und 3.11 zeigt sich nach Darstellung der Mitochondrien (TOM20) ein tubuläres bis retikuläres Muster. Die grüne Fluoreszenz der jeweiligen GFP-VAMP-1a bzw. -1b Fusionsproteine lässt hingegen das typische punktierte Verteilungsmuster beider VAMP-Isoformen erkennen (vergleiche Abbildung 3.2). Insgesamt kann keine wesentliche Überlappung der Signale von TOM20 mit der jeweiligen GFP-markierten VAMP-Isoform nachgewiesen werden (Abbildung 3.10 und 3.11, Überlagerung). Eine wesentliche Sortierung von VAMP-1a oder -1b zu Mitochondrien erscheint daher unwahrscheinlich. Das Fehlen der Sortierung von VAMP-1a zu Mitochondrien stimmt überein mit den Beobachtungen von Isenmann und Mitarbeitern, welche ebenfalls keine Koloalisation dieser VAMP-1 Isoform mit dem mitochondrialen Marker TOM20 sehen konnten (Isenmann et al., 1998).

#### **3.4.2 VAMP-1a und -1b sortieren nicht zu Peroxisomen.**

Um zu untersuchen, ob VAMP-1 in das peroxisomale Kompartiment der Zelle sortiert wird, wurden RFP-VAMP-1a und -1b Isoformen zusammen mit einem GFP-Vektor kotransfiziert, der die C-terminale peroxisomale Sortierungssequenz (-SKL) aufweist. Mit dieser spezifischen Sequenz fusioniert, fungiert GFP hier als Peroxisomenmarker und wurde bereits als solcher in anderen Originalarbeiten herangezogen (Delille et al., 2010). Hierbei zeigt sich im grünen Kanal ein für Peroxisomen typisches punktiertes Muster. Ebenfalls bleibt die Plasmamembran weitestgehend ohne Markierung. Wie durch Pfeile in der Vergrößerung hervorgehoben, lassen sich immer wieder vorwiegend rote und grüne Signale abgrenzen (Abbildung 3.12 und 3.13).

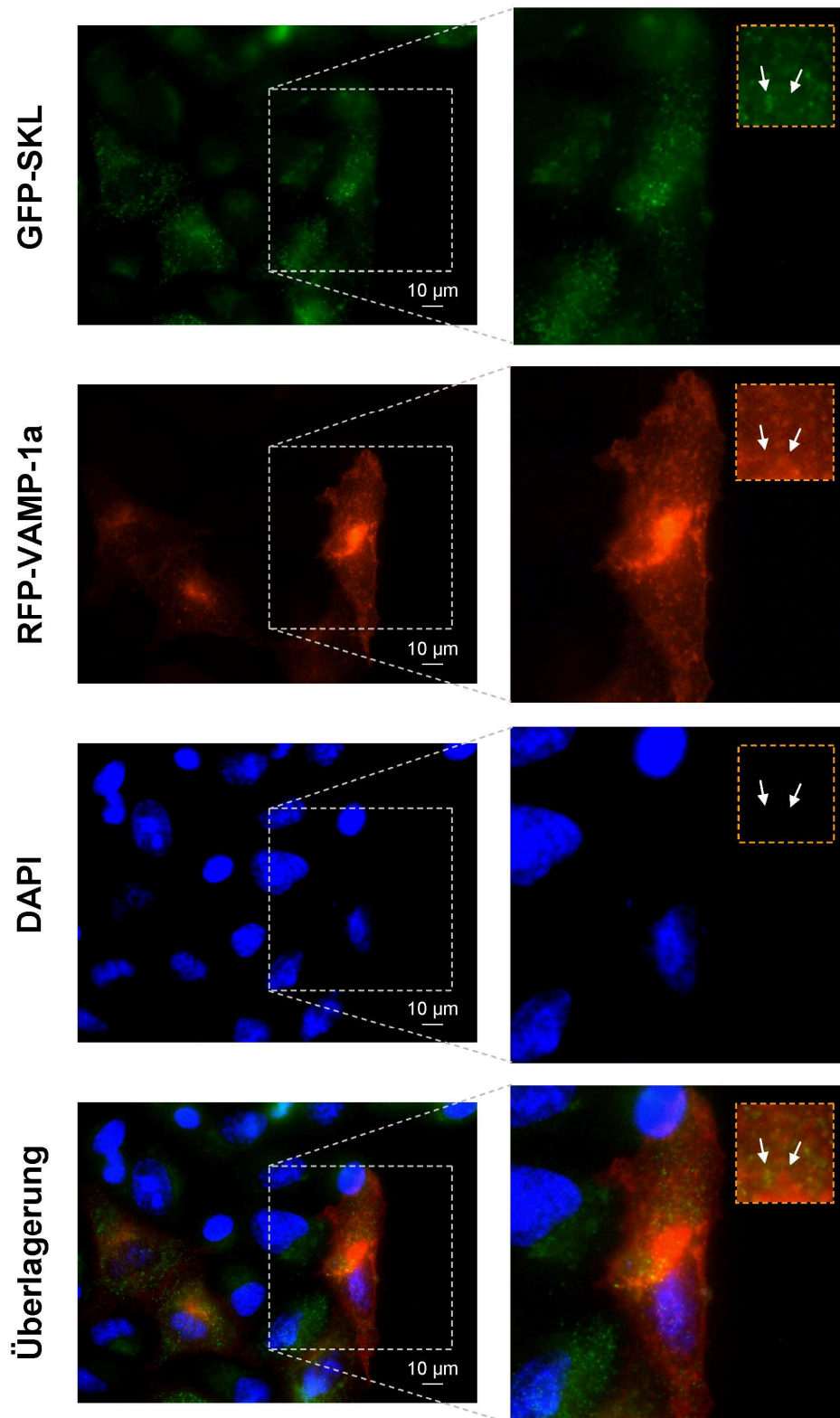


**Abbildung 3.10 VAMP-1a sortiert nicht zu Mitochondrien.** In der Überlagerung des GFP-VAMP-1a Signals (grün) mit dem Signal des Mitochondrienmarkers TOM20 (rot) zeigt sich keine wesentliche Überlappung.

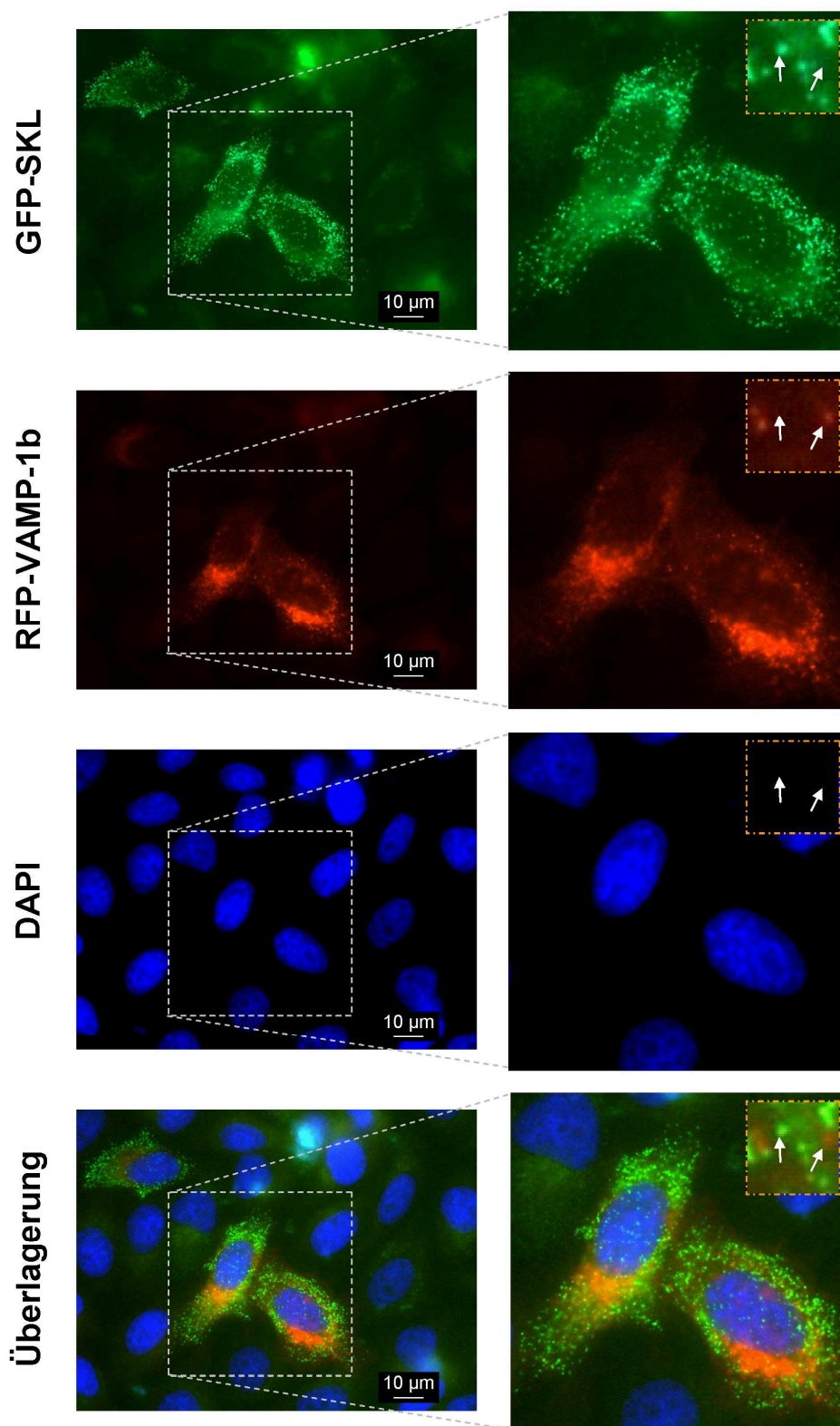


**Abbildung 3.11 VAMP-1b sortiert nicht zu Mitochondrien.** In der Überlagerung des GFP-VAMP-1b Signals mit dem Signal des Mitochondrienmarkers TOM20 zeigen sich überwiegend grüne und rote Bereiche, welche separat voneinander erscheinen und besonders in peripheren Bereichen der Zelle deutlich werden (siehe Pfeile).





**Abbildung 3.12 VAMP-1a sortiert nicht zu Peroxisomen.** Es stellen sich praktisch nur grüne bzw. rote vesikuläre Strukturen dar (Pfeile). Vereinzelt perinukleär erscheinende gelbe Strukturen werden aufgrund der starken Expression in diesem Bereich nicht als positiv gewertet. (Beurteilt wurden Zellen, die beide Proteine koexprimieren).



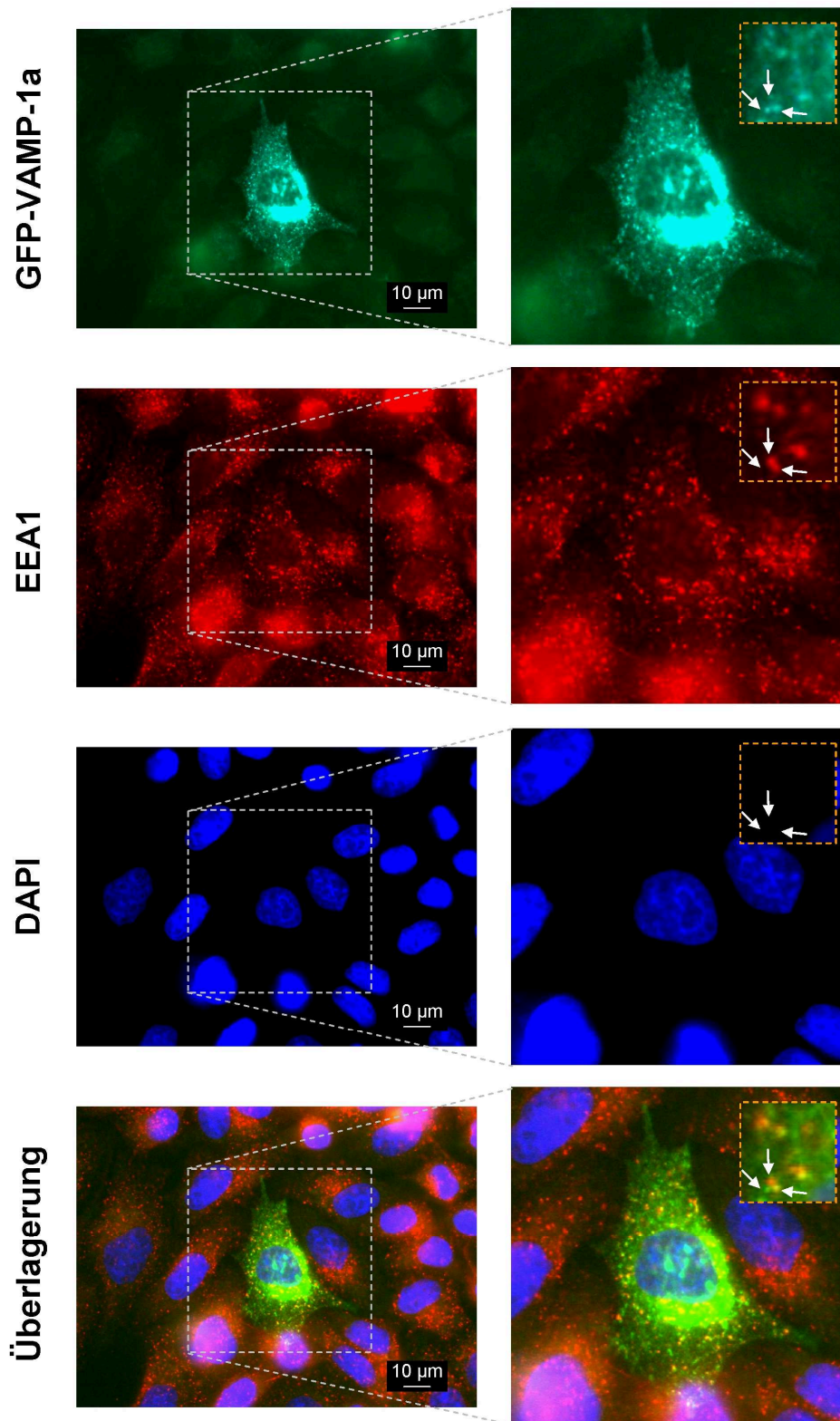
**Abbildung 3.13 VAMP-1b sortiert nicht zu Peroxisomen.** Auch nach Kotransfektion von RFP-VAMP-1b und GFP-SKL stellen sich lediglich klar voneinander abgrenzbare grüne und rote Vesikelstrukturen dar (Pfeile). Gelbe Bereiche, welche auf eine Kolokalisation beider Proteine hinweisen, zeigen sich nicht. (Beurteilt wurden Zellen, die beide Proteine koexprimieren).

### 3.4.3 Hinweise auf eine Expression von VAMP-1a und VAMP-1b in vereinzelt Bereichen früher Endosomen

Für die Darstellung des frühen endosomalen Kompartiments der Zelle wurde ein Antikörper gegen EEA1, einem Marker früher Endosomen (*early endosomes*), eingesetzt. EEA1 entspricht in seiner Funktion einem *Tethering*-Faktor, der bei der Fusion früher Endosomen mit späten Endosomen eine Rolle spielt, indem er die Annäherung von SNARE-Proteinen aneinander unterstützt (Dumas et al., 2001). In der Überlagerung des jeweiligen GFP-VAMP-1-Signals (grün) mit dem Signal für EEA1 (rot) sieht man ein typisches punktförmiges Verteilungsmuster für das frühe endosomale Kompartiment. Es zeigen sich einzelne EEA1-positive Vesikel, die auch eine Expression von GFP-VAMP-1a bzw. GFP-VAMP-1b (Abbildung 3.14 und 3.15, gelbes Signal in der Überlagerung) aufweisen und bei GFP-VAMP-1a deutlicher zur Darstellung kommen. Eine Sortierung von VAMP-1a und -1b zu frühen Endosomen erscheint daher möglich.

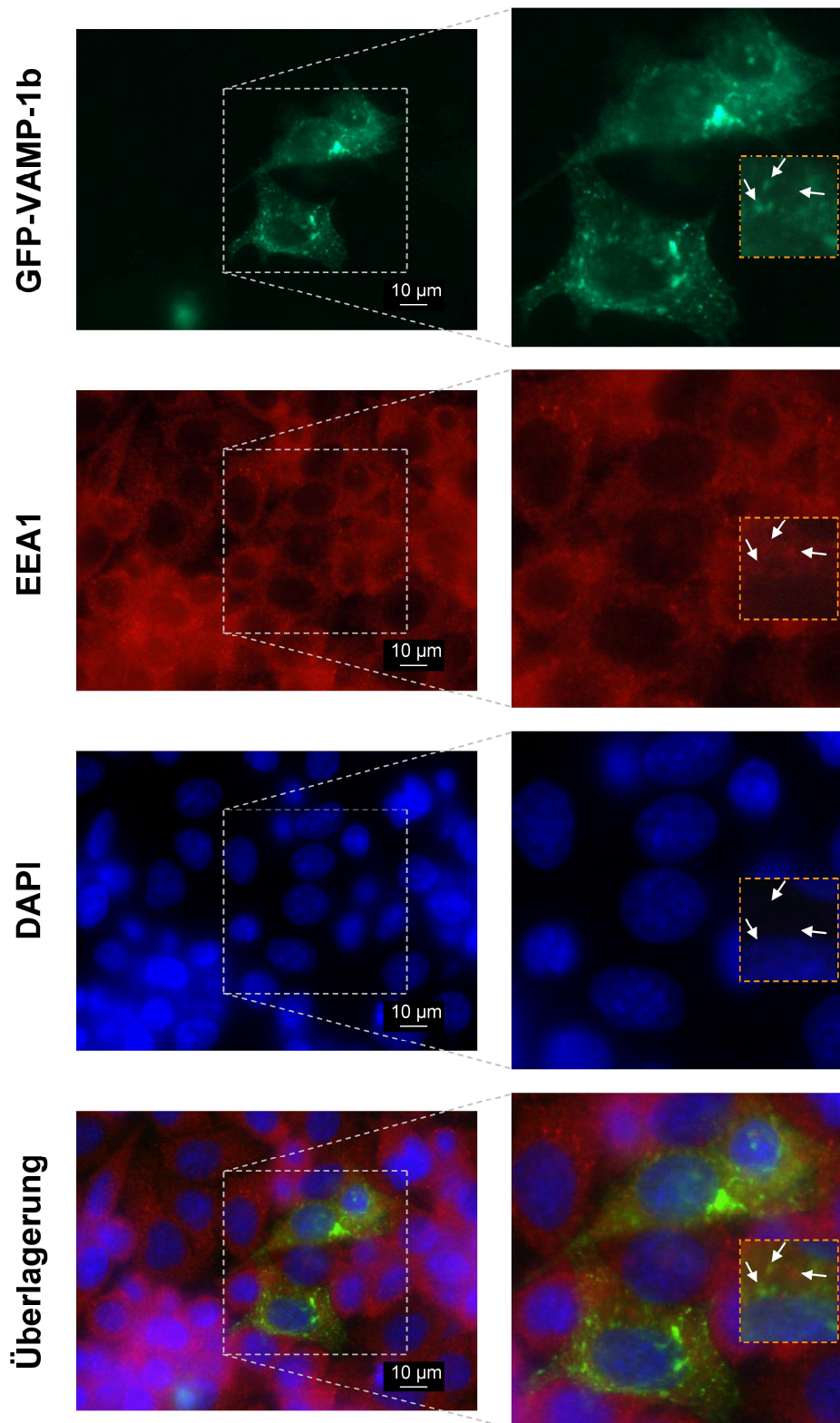
### 3.4.4 Hinweise auf eine potentielle Kolokalisation von VAMP-1a und VAMP-1b mit Lysosomen

Der Lysosomenmarker LAMP-3 (*lysosome-associated membrane protein 3*) diene zur Darstellung des späten endosomalen Kompartiments mit Übergang zum Lysosom. Es handelt sich bei LAMP-3 um ein integrales stark glykosyliertes Membranprotein in der äußeren Lysosomenmembran, das zusammen mit LIMPs (*lysosomal integral membrane protein*) ca. 50% der Proteine in dieser Membran ausmacht und zur Sortierung in das Lysosom vom TGN Kontakte mit Adaptorkomplexen eingeht (Gough et al., 1999; Eskelinen, 2006). Es ergibt sich für LAMP-3 ein punktiertes Verteilungsmuster mit Betonung im Bereich eines perinukleären Saums. Die Überlagerung lässt erkennen, dass auch hier der überwiegende Anteil der VAMP-haltigen Vesikel nicht mit LAMP-3-positiven Vesikeln kolokalisiert (Abbildung 3.16 und 3.17). Dennoch weisen einzelne Vesikel, in denen das Signal des GFP-markierten VAMP-1a bzw. -1b mit der Fluoreszenz von LAMP-3 überlagert erscheint (gelbes Signal), auf eine möglichen Sortierung von VAMP-1 zu Lysosomen hin.

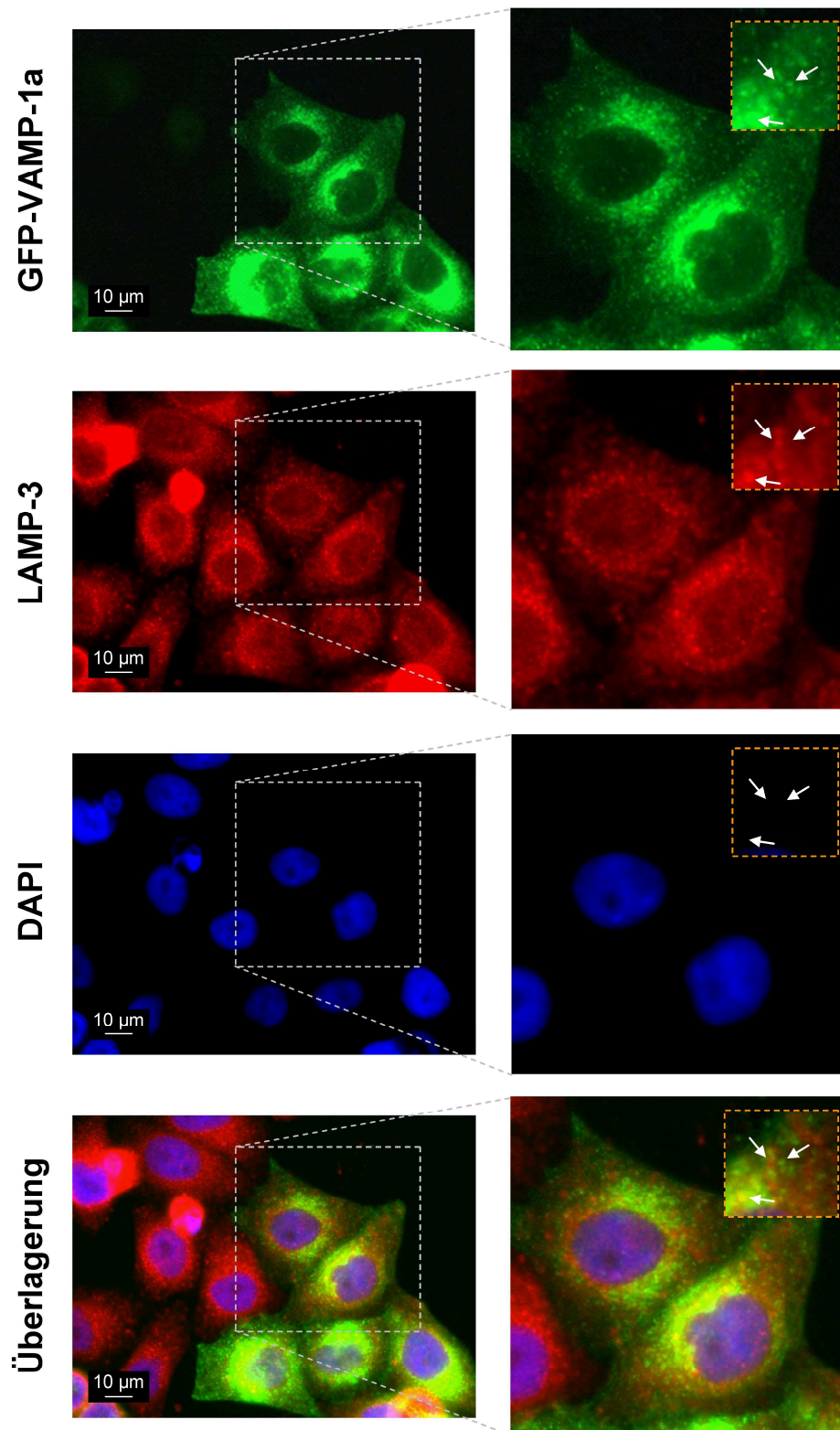


**Abbildung 3.14 Untersuchungen zur möglichen Kolo-kalisation von GFP-VAMP-1a mit frühen Endosomen.** Die weißen Pfeile weisen auf eine Gruppe von Vesikeln hin, in der grüne, rote wie auch gelbe Vesikel darstellbar sind. Somit könnte hier eine partielle Kolo-kalisation von VAMP-1a mit frühen endosomalen Strukturen vorliegen.

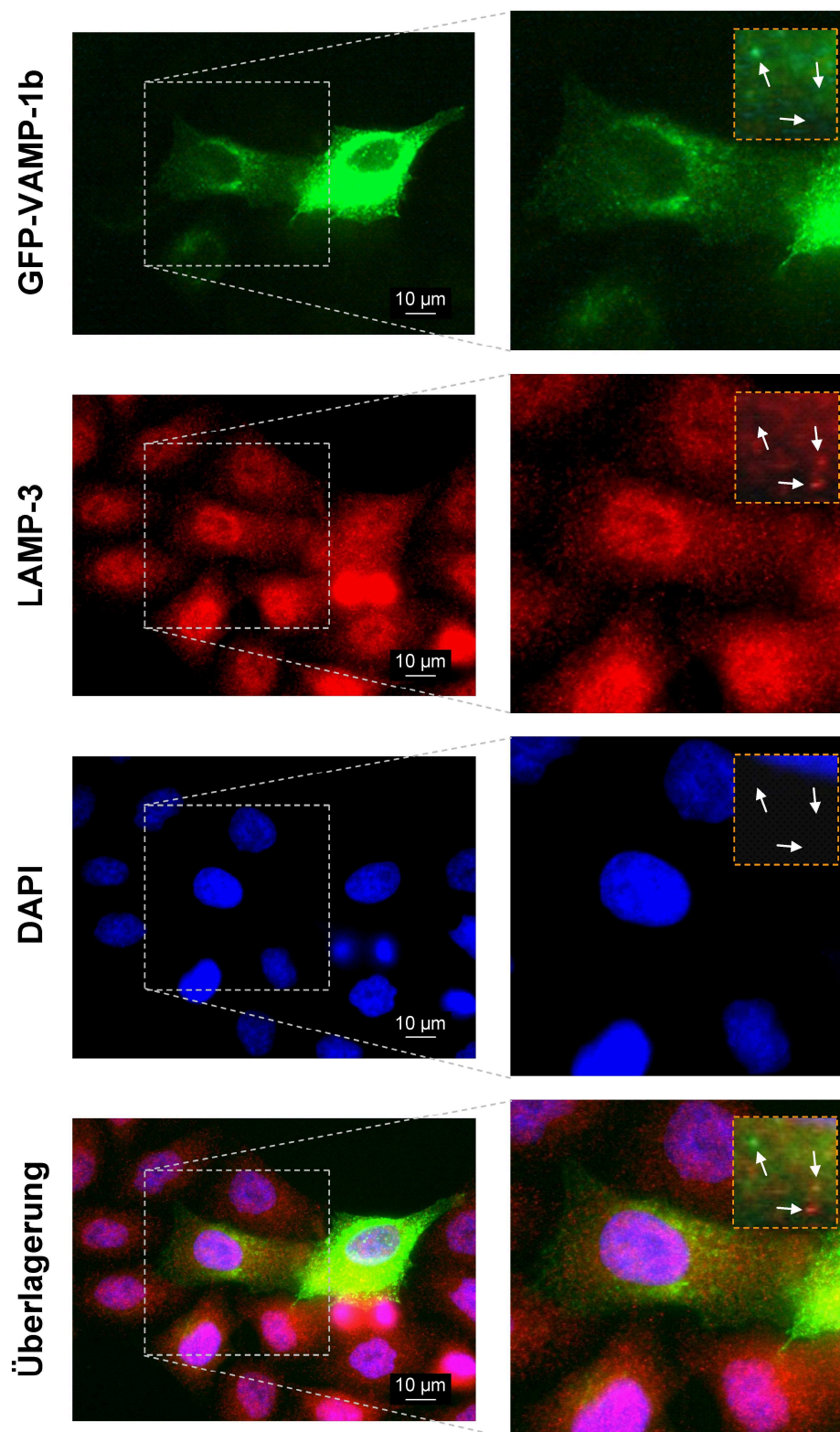




**Abbildung 3.15 Untersuchungen zur möglichen Kolo-kalisation von GFP-VAMP-1b mit frühen Endosomen.** Eine Kolo-kalisation von GFP-VAMP-1b mit dem frühen Endosomenmarker EEA1 ist vereinzelt schwach darstellbar. Nachweisbar sind vorwiegend rote und grüne vesikuläre Strukturen (Pfeile).



**Abbildung 3.16 Untersuchungen zur möglichen Kolo-kalisation von GFP-VAMP-1a mit Lysosomen.** Einzelne Vesikel zeigen eine Koexpression von GFP-VAMP-1a mit dem lysosomalen Marker LAMP-3, wohingegen der überwiegende Anteil der dargestellten Vesikel nur eine der beiden Isoformen exprimiert. (Pfeile weisen auf grüne, rote sowie gelbe vesikuläre Strukturen hin).



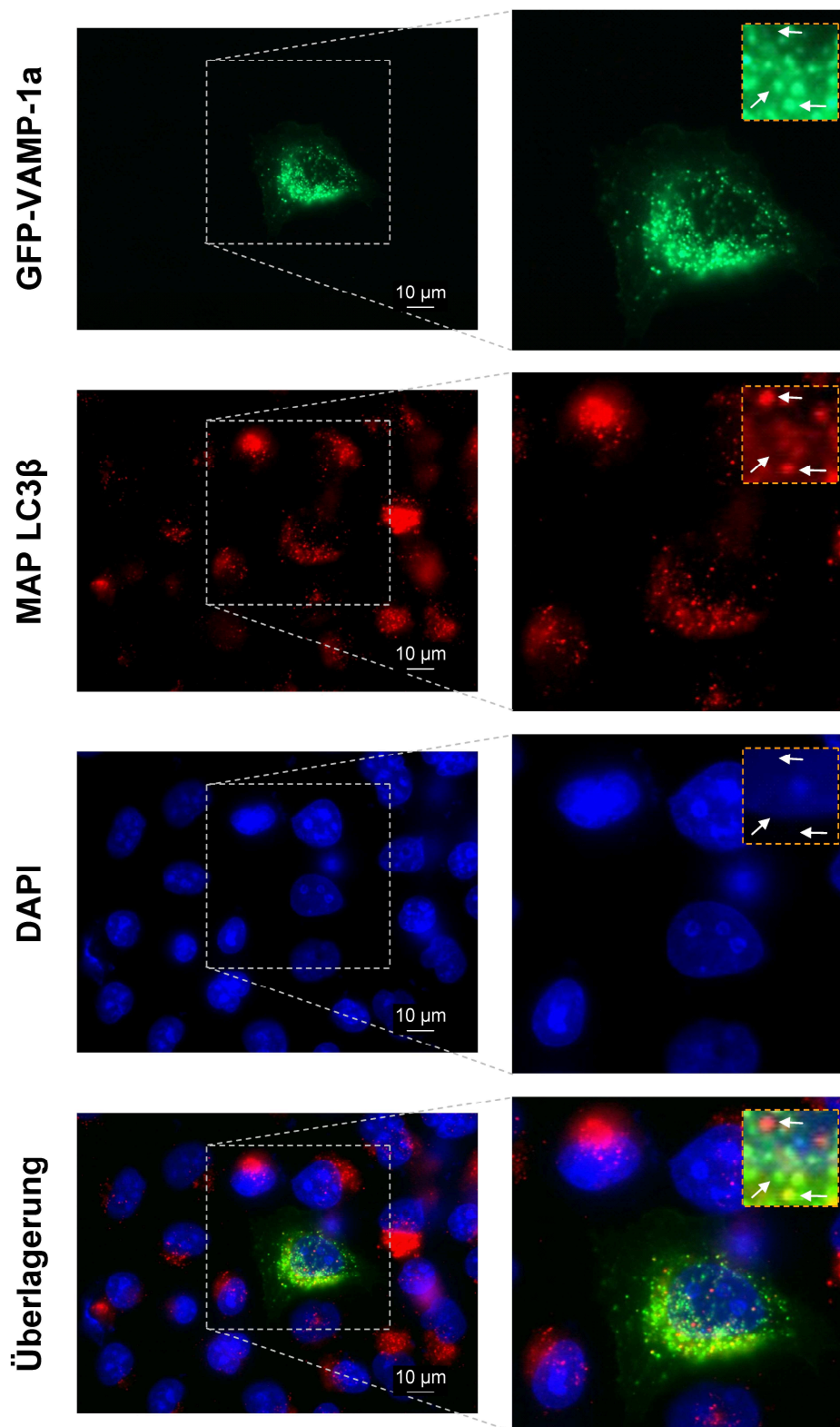
**Abbildung 3.17 Untersuchungen zur möglichen Kolo-kalisation von GFP-VAMP-1b mit Lysosomen.** Vergleichbar mit den Beobachtungen für GFP-VAMP-1a, so findet sich auch bei VAMP-1b, bis auf vereinzelte in der Überlagerung gelb erscheinende Vesikel, kaum eine Kolo-kalisation beider Proteine. (Pfeile weisen auf grüne, rote sowie gelbe vesikuläre Strukturen hin).



### **3.4.5 Untersuchungen zur möglichen Lokalisation von VAMP-1a und VAMP-1b in Autophagosomen**

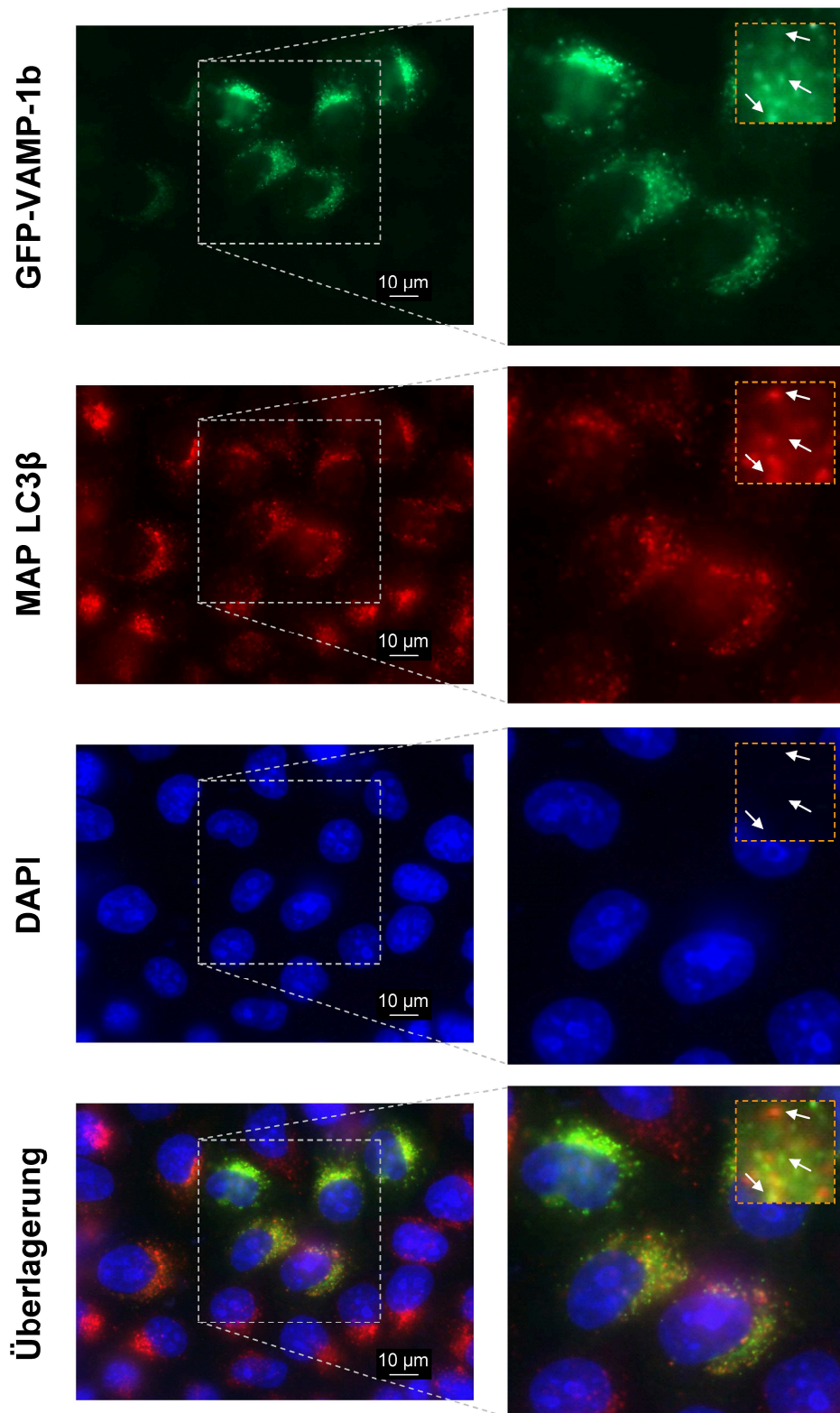
Das autophagosomale-lysosomale System stellt in eukaryoten Zellen neben dem Ubiquitin-Proteasom-System einen wesentlichen Mechanismus der Degradation intrazellulärer Proteine bzw. Bestandteile dar. Obwohl Autophagosomen und Lysosomen in engem Kontakt stehen mit konvergierenden Transportrouten und teils auch über Fusion (Tooze et al., 1990; Liou et al., 1997), zeigt MAP LC3beta keine überlappende Lokalisation mit lysosomalen Markern (Kabeya et al., 2000; Lazova et al., 2012). Als ein weiteres zelluläres Kompartiment wurden Autophagosomen in die Untersuchung der Kolokalisation mit VAMP-1 Isoformen mit einbezogen. Als Autophagosomen-Marker wurde MAP LC3beta gewählt, welches Bestandteil der Autophagosomen-Membran ist und eine Assoziation mit Mikrotubuli aufweist (MAP = Microtubuli-assoziiertes Protein) (Seglen and Bohley, 1992; Klionsky, 2005).

Wie in den Abbildungen 3.18 und 3.19 dargestellt, zeigt sich ein grob punktiertes Fluoreszenzmuster für MAP LC3beta. Der weit überwiegende Teil der Signale von MAP LC3beta und der jeweiligen VAMP-1 Isoform zeigt keine Überlagerung. Vereinzelt kann jedoch für einzelne vesikuläre Strukturen eine Kolokalisation beobachtet werden, so dass zumindest eine partielle Sortierung beider VAMP-1 Isoformen zu Autophagosomen als möglich angesehen werden kann.



**Abbildung 3.18 Kolokalisation von GFP-VAMP-1a mit Autophagosomen.**

Es lassen sich im vorliegenden Fall neben Vesikeln, die eine vorwiegend rote oder grüne Fluoreszenz aufweisen, auch vesikuläre Strukturen erkennen, die eine Überlappung von GFP-VAMP-1a mit MAP LC3beta (gelbes Signal) zeigen (Pfeile).



**Abbildung 3.19 Kolokalisation von GFP-VAMP-1b mit Autophagosomen.**

Vergleichbar mit den Beobachtungen für VAMP-1a (Abbildung 3.18) finden sich auch hier überwiegend Vesikel, die nur eine rote oder grüne Fluoreszenz aufweisen, wobei vereinzelt auch unscharfe vesikuläre Strukturen darstellbar sind, bei welchen sich eine mögliche Überlappung zeigt (Pfeile).

## 4. Diskussion

### 4.1 Der C-Terminus als Sortierungssignal in VAMPs und anderen SNARE-Proteinen

Im Jahre 1998 wurde von Isenmann et al. eine Spleißvariante des humanen VAMP-1 Gens beschrieben, welche sich wie das zuvor bei der Ratte charakterisierte VAMP-1b (Mandic et al., 1997) am C-Terminus von der ursprünglichen VAMP-1 Form (VAMP-1a) in der Sequenz unterschied und daher entsprechend VAMP-1B genannt wurde (Isenmann et al., 1998). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die neue Isoform zu Mitochondrien sortierte und dass dies abhängig war vom Vorhandensein der intraluminalen C-terminalen Sequenz in VAMP-1B.

Genau wie bei den zuvor beschriebenen VAMP-1 Spleißvarianten bzw. anderen SNARE-Spleißvarianten wie bei VAMP-2 oder Syntaxin zeigt sich eine differentielle Expression der verschiedenen humanen Isoformen in unterschiedlichen Geweben und Zelllinien, wobei VAMP-1A vorwiegend im Zentralen Nervensystem und das humane VAMP-1B in nicht-neuronalen Geweben exprimiert wird. Die C-terminale Sequenz in der humanen VAMP-1B Isoform unterscheidet sich von den ursprünglichen Sequenzen der drei initial charakterisierten VAMPs 1, 2 oder 3 durch das Vorhandensein dreier positiv geladener Aminosäuren anstelle einer ungeladenen Aminosäure wie Threonin oder Serin, welche sich an den Transmembran-Anker anschließen. Somit ergibt sich ein Motiv, das auch von anderen C-terminal verankerten Proteinen mit mitochondrialer Lokalisation bekannt ist und in ähnlicher Form (hydrophober Kern, auf beiden Seiten flankiert von basischen Aminosäuren) auch in Proteinen mit anderer subzellulärer Lokalisation vorkommt (z.B. Syntaxin 2 in der Plasmamembran) (Isenmann et al., 1998). Mittels N-terminalen Markersignalen für Antikörper-Bindung, die mit der entsprechenden variablen C-terminalen Sequenz fusioniert wurden, konnte eine Sortierung der entsprechenden VAMP-Isoform innerhalb der Zelle verfolgt werden (Isenmann et al., 1998). Es stellte sich heraus, dass die Verkürzung der hydrophoben Sequenz in Zusammenhang mit der zusätzlichen Einführung einer positiven Ladung zu einer Sortierung der VAMP-1B Isoform zu Mitochondrien führt. Das humane VAMP-1B ebenso wie das VAMP-1b der Ratte enthält zwei positive Ladungen im C-Terminus (-RRD bzw. -SKYR). Für eine Funktion des C-Terminus als mitochondriales Sortierungssignal gibt es entsprechende Beispiele auch bei anderen Proteinen wie z.B. bei Bcl-2 (Nguyen et al., 1993), Cytochrom b5 (De et al., 1995) oder Synaptojanin 2, dessen C-Terminus,

welcher ebenfalls durch alternatives RNA-Spleißen moduliert wird, mit einem Protein (OMP25, *outer membrane protein* 25) der äußeren Mitochondrienmembran interagiert (Nemoto and De, 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen kein Hinweis auf eine Kolo-kalisation der VAMP-1a oder VAMP-1b Isoformen mit dem mitochondrialen Marker TOM20, weshalb davon auszugehen ist, dass der variable C-Terminus in diesen beiden VAMP-1 Isoformen keinem mitochondrialen Sortierungssignal entspricht, was im Einklang steht mit den Untersuchungen von Isenmann et al. (Isenmann et al., 1998).

Welche funktionelle Bedeutung die humane VAMP-Isoform VAMP-1B im Mitochondrium innehat und ob sie *in vivo* tatsächlich, wie von Isenmann et al. postuliert, bei der Mitochondrienfusion eine Rolle spielt, ist noch unklar. Weitere VAMP-1 Isoformen mit gewebsspezifischer Verteilung wurden von Berglund et al. 1999 mittels eines RT-PCR-Screens identifiziert, wobei gezeigt wurde, dass die humane VAMP-1D Isoform mit der zuvor in der Ratte beschriebenen Isoform VAMP-1b in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmt (Berglund et al., 1999). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei der VAMP-1b Isoform der Ratte und der humanen VAMP-1B Isoform um zwei verschiedene VAMP-1 Isoformen handelt, insbesondere, da VAMP-1 Isoformen mit der identischen C-terminalen Sequenz in beiden Spezies nachweisbar sind. Weiterhin weist die hohe Konservierung dieser Sequenzen auf eine mögliche essentielle Funktion dieser Isoformen für die Zelle hin, die zelltypspezifisch (z.B. neuronal, nicht-neuronal) sein kann. Ähnlich wie bei VAMP-1, so existieren auch für andere SNARE-Proteine wie z.B. Syntaxin verschiedene Spleiß-Isoformen (Bennett et al., 1993; Ibaraki et al., 1995; Jagadish et al., 1997; Simonsen et al., 1998), welche sich in der N-terminalen Domäne des SNARE-Motivs, nahe der Transmembrandomäne oder im C-terminalen hydrophoben Membrananker unterscheiden.

Quinones et al. zeigten z.B. für Syntaxin, dass mit der differentiellen Expression von Syntaxin 2 Isoformen in verschiedenen Geweben (Syntaxin 2D beschränkt auf Hirn) auch unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen der am C-Terminus variablen Isoformen einhergehen. In zwei Epithelzelllinien (MDCK und Caco-2) fand sich Syntaxin 2A überwiegend im apikalen Membranbereich, während Syntaxin 2B auch basolateral nachzuweisen war (Quinones et al., 1999). Andere experimentelle Studien zeigten, dass für Syntaxine ein Zusammenspiel der Transmembrandomäne



mit einem im N-Terminus lokalisierten Di-Leucin-Motiv, welches die Bindung an Clathrin-Adaptor-Proteine vermittelt, als Sortierungssignal fungiert (Kasai and Akagawa, 2001; Salaun et al., 2004). Eine Verkürzung der Transmembrandomäne führte bei Syntaxin 3 zu einer Akkumulation im Golgi-Apparat (Watson and Pessin, 2001). In Syntaxin-Chimären sorgt die Einführung der Syntaxin 3 Transmembrandomäne zu einer apikalen Lokalisation, die der Syntaxin 4 Transmembrandomäne zur basolateralen Lokalisation (Bulbarelli et al., 2002). Ähnlich wie bei Syntaxin wäre daher auch bei VAMP-1 vorstellbar, dass Änderungen in der Sequenzlänge der Transmembrandomäne der VAMP-1 Isoformen ebenfalls die Sortierung dieser v-SNARE-Proteine beeinflussen könnten und der polare, variable intraluminale Teil der Sequenz bei der Stabilisierung der Transmembrandomäne in der Membran eine Rolle spielt.

#### **4.2 Mögliche Bedeutung von VAMP-1 und seinen Spleiß-Isoformen bei pathologischen Zuständen**

In einer 2007 veröffentlichten Untersuchung konnte eine Nonsense-Mutation im VAMP-1 Gen mit der Folge einer fehlenden Expression des Proteins mit einem autosomal-rezessiv auf Chromosom 6 vererbten Phänotyp in der Maus (sogenannte *lethal wasting mutant*) in Verbindung gebracht werden. Hierbei werden die betroffenen Mäuse zunehmend immobil, bis sie circa zwei Wochen *post partum* versterben, ohne dass histologisch Hirnveränderungen nachgewiesen werden können (Nystuen et al., 2007). Die Rolle des VAMP-1 Proteins liegt hierbei in der Beeinträchtigung der calciumabhängigen Transmission im Bereich der neuromuskulären Endplatte (Liu et al., 2011).

Weitere Auffälligkeiten im Expressionsmuster von VAMP-1, die beschrieben wurden, zeigen sich bei unterschiedlichsten neurologischen Störungen oder treten auf als reaktive Veränderungen. So kommt es z.B. bei generalisierter Hypoxie im Hirngewebe zu einer vermehrten Expression von VAMP-1, während die Expression von Syntaxin 1, einem anderen SNARE-Protein, supprimiert wird (Fei et al., 2007).

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer zeigen sich auffällige Expressionsänderungen dieses v-SNARE-Proteins. VAMP-1 war als einziges der untersuchten Vesikelmembranproteine in jeder der verschiedenen untersuchten Hirnregionen supprimiert. Präsynaptische t-SNAREs mit Sitz in der Plasmamembran wie SNAP-25 und Syntaxin zeigen dagegen normale Expressionslevel (Sze et al., 2000). Bei Schizophrenie-Patienten ist als Ausdruck

einer allgemeinen Abnormalität VAMP-1 im Gyrus temporalis superior, welcher für das Sprachverständnis notwendig ist, signifikant erniedrigt (Sokolov et al., 2000).

Neben Motoneuronen wird VAMP-1 auch in sensorischen Neuronen exprimiert, wo es die Ausschüttung von CGRP (*calcitonin-gene-related-peptide*) vermittelt, welches als Vasodilatator bei der Migräne eine Rolle spielt und durch Botulinumtoxin gehemmt werden kann (Meng et al., 2007).

Die oben genannten Beispiele beziehen sich auf die ursprünglich beschriebene VAMP-1 Isoform, welche identisch ist mit VAMP-1a. Die Bedeutung eines fehlerhaften Spleißens des VAMP-1 Gens für die Pathogenese einer umschriebenen erblichen Bewegungsstörung wurde jedoch erst 2012 mit der Arbeit von Bourassa et al. deutlich, als gezeigt werden konnte, dass die seltene neurodegenerative Erkrankung Spastische Ataxie 1 (Hereditäre spastische Ataxie, HSA) mit einer *Loss-of-function*-Mutation des VAMP-1 Gens zusammen hängt (Bourassa et al., 2012). In drei betroffenen Familien im kanadischen Neufundland sowie drei zusätzlichen davon unabhängigen Patienten konnten Erkrankungsfälle zunächst mit der Chromosomenregion 12p13 in Zusammenhang gebracht werden, bis schließlich das VAMP-1 Gen als Ursprungsort identifiziert wurde. Hierbei betrifft eine kritische Mutation die Donor-Stelle für das VAMP-1 Spleißen im Exon 4, welches im Normalfall die Generierung von VAMP-1A mRNA steuert, die im Hirn eine hohe Expression aufweist. Ein Ausfall von VAMP-1A in strategischen Bewegungszentren des Hirnstamms und Kleinhirns (Elferink et al., 1989; Trimble et al., 1990) könnte daher die klassischen Symptome der Erkrankung erklären, welche nicht nur Bewegungsstörungen der unteren Extremitäten einschließt, sondern auch mit Augen- und Zungenbewegungsstörungen sowie einem gestörten Schluckakt einhergeht. Aufgrund der von Bourassa und Mitarbeitern nachgewiesenen Position der Mutation lässt sich voraussagen, dass hierdurch das normale Spleißen der humanen Isoformen VAMP-1A und VAMP-1B kompromittiert wird, während eine mit humanem VAMP-1D bzw. Ratten-VAMP-1b vergleichbare Isoform bevorzugt generiert wird. Die Autoren gehen davon aus, dass der entsprechende klinische Phänotyp in erster Linie auf einen Ausfall der VAMP-1A Funktion zurückzuführen ist und weniger auf die zusätzliche Herstellung einer normalerweise in diesen Zellen nicht exprimierten Isoform mit evtl. abweichender subzellulärer Lokalisation, da die Isoform VAMP-1D bzw. VAMP-1b im Normalfall keine wesentliche Expression im Hirngewebe aufweist (Mandic et al., 1997; Isenmann et al., 1998). Ein aktiver Beitrag der VAMP-1b-

ähnlichen VAMP-1D Isoform zum Gesamtbild der Erkrankung lässt sich jedoch nicht vollständig ausschließen. Interessanterweise kann aus den Untersuchungen von Bourassa et al. zumindest teilweise geschlossen werden, dass VAMP-1b-ähnliche Isoformen offensichtlich nicht die Funktion von VAMP-1A ersetzen können, was die Möglichkeit einer spezifischen gewebeabhängigen Funktion der Rattenisoformen VAMP-1a und -1b weiter stützt. Inwiefern eine mögliche unterschiedliche Sortierung beider Isoformen in spezifische subzelluläre Kompartimente in Verbindung mit dem klinischen Phänotyp steht, ist eine interessante Fragestellung für weiterführende Studien.

#### **4.3 Ähnlichkeit der C-terminalen Sequenz von VAMP-1b mit dem Sortierungssignal peroxisomaler Proteine**

Interessanterweise zeigt die Sequenz (-SKL), welche für die Sortierung einer Gruppe peroxisomaler Matrixproteine zu Peroxisomen notwendig ist und als PTS1 (*peroxisomal targeting signal 1*) bezeichnet wird (Subramani, 1998), eine auffällige Ähnlichkeit mit der entsprechenden C-terminalen Sequenz in VAMP-1b (-SKYR). Zum Beispiel ist die Sequenz -SKL alleine ausreichend, um eine peroxisomale Sortierung eines Proteins hervorzurufen. So zeigen GFP- bzw. RFP-Konstrukte, bei welchen dieses Signal C-terminal angehängt wurde, eine Sortierung in dieses subzelluläre Kompartiment (Monosov et al., 1996). Es lag daher nahe, zu testen, ob die entsprechende Sequenz in VAMP-1b ebenfalls als potentiell peroxisomales Sortierungssignal fungieren könnte. Ein einfaches Anhängen der Sequenz -SKYR, analog zu -SKL, an GFP zeigte kein Peroxisomen-typisches Signal, sondern ein zytosolisches Verteilungsmuster (siehe Abbildung 8.1, Anhang). Im Gegensatz zu peroxisomalen Matrix-Proteinen, welche, wie man annimmt, aus dem Zytosol direkt in die peroxisomalen Membranen eingefügt werden, handelt es sich bei VAMP-1b um ein Typ II-Membranprotein, welches primär in die Membranen des endoplasmatischen Retikulums eingebaut wird (Kutay et al., 1995). In vergleichbarer Weise durchlaufen auch bestimmte peroxisomale Membranproteine mit C-terminalem hydrophobem Transmembrananker erst eine posttranslationelle Insertion in die Membranen des ER, bevor sie ihre Zielorganelle erreichen, wie es z.B. für Pex15p nachgewiesen wurde (Elgersma et al., 1997). Dagegen können Proteine, die zum Beispiel die äußere Mitochondrienmembran erreichen sollen, direkt aus dem Cytosol dorthin verbracht werden, also ohne Umweg über das ER (Borgese et al., 2001). Auch für die peroxisomale Ascorbatperoxidase APX, ein peroxisomales

Membranprotein, konnte gezeigt werden, dass als Sortierungssignal, im Gegensatz zum klassischen Signal -SKL für Matrixproteine, eine positiv geladene evolutionär konservierte Domäne in Zusammenhang mit der angrenzenden hydrophoben Transmembrandomäne die entsprechende Lokalisationssequenz darstellt und durch Transport über das ER zu einer Sortierung in die Peroxisomen führt (Mullen and Trelease, 2000). Hierbei ist nicht nur die C-terminale Sequenz sondern auch die Hydrophobizität der Transmembrandomäne von Bedeutung. Somit kann vermutet werden, dass VAMP-1 als membrangebundenes Protein ebenfalls dem zuletzt beschriebenen Sortierungspfad über das ER mittels eines positiv geladenen Sortierungssignals folgen könnte. Daher wurde zur Beurteilung des Sortierungsverhaltens *in vivo* das in voller Länge mit RFP fusionierte VAMP genutzt. Die Beobachtung, dass für VAMP-1a und VAMP-1b, denen dieser typische positiv geladene Bereich fehlt, keine wesentliche peroxisomale Lokalisation nachgewiesen werden konnte, passt somit in das Verhalten eines Membranproteins ohne peroxisomale Sortierungssequenz. Auch wenn keine offensichtliche Sortierung beider VAMP-1 Isoformen zu Peroxisomen nachgewiesen wurde, so weist die Ähnlichkeit der C-terminalen Sequenz zwischen VAMP-1b und peroxisomalen Proteinen auf eine mögliche Bedeutung der C-terminalen Sequenz in VAMP-1b als Sortierungssignal hin.

#### **4.4 VAMP und Endozytose**

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es einen kleinen Anteil an VAMP-1-positiven Vesikeln zu geben scheint, welche dem frühen endosomalen Kompartiment zuzuordnen sind, da diese auch positiv sind für den Marker EEA1. Ebenso zeigen sich einzelne Vesikel des lysosomalen als auch des autophagosomalen Kompartiments, welche durch LAMP-3 bzw. MAP LC3beta charakterisiert sind, teilweise positiv für beide VAMP-1 Isoformen.

Wie zuvor berichtet, entstammen synaptische Vesikelproteine in PC12 Zellen der Endozytose, wobei entweder frühe Endosomen als eigenständige Kompartimente oder spezielle Invaginationen der Plasmamembran als Ursprung in Frage kommen (Heuser and Reese, 1973; Regnier-Vigouroux and Huttner, 1993; Royle and Lagnado, 2003). Somit müssen Nervenendigungen in der Lage sein, verschiedene Populationen an Vesikel-Membranproteinen in einem Recyclingkreislauf erneut für die Biogenese synaptischer Vesikel zu regenerieren (Voglmaier and Edwards, 2007).

Experimentell wurde gezeigt, dass VAMP-Proteine zwar über den sekretorischen Pfad zur Plasmamembran gelangen können und somit eine Glykosylierung als typische Modifikation in ER und Golgi erhalten (Kutay et al., 1995), jedoch im Fließgleichgewicht (*steady state*) nur zu einem kleinen Anteil in frühen Kompartimenten zu finden ist, während ein bedeutender Anteil in sekretorischen Granula gespeichert ist (Papini et al., 1995; Chilcote et al., 1995) bzw. in einem Kreislauf zwischen Plasmamembranen und Endosomen zirkuliert. In transfizierten PC12 Zellen ist ein Großteil von VAMP in frühen Endosomen zu finden, entsprechend ähnelt die Verteilung im *steady state* der Verteilung nach Internalisierung mittels Endozytose; hierbei ergibt sich in der Fluoreszenz ein ähnliches Muster wie das von Synaptophysin oder dem Transferrin-Rezeptor als einem typischen Endosomenmarker (Cameron et al., 1991; Grote and Kelly, 1996). Nicht überraschend konnten in den vorliegenden Untersuchungen einzelne kolokalisierende Signale im frühen endosomalen Kompartiment für VAMP-1a bzw. -1b beobachtet werden.

Eine Erklärung für den nur geringen Anteil an VAMP-1 in diesem Kompartiment könnte z.B. sein, dass die Zellen nur passager transfiziert wurden und es somit im Verlauf ohne gezielte Stimulation nur wenig Exozytose-Vorgänge gab, die zu einer konsekutiven Endozytose führten.

Prinzipiell kann eine Regenerierung der Vesikelkomponenten nach Exozytose auf verschiedenen miteinander konkurrierenden Mechanismen beruhen (Voglmaier et al., 2006) - zum Einen der klassischen Clathrin-abhängigen Endozytose mit Involvierung des AP2-Adaptorprotein-Komplexes bei moderater Stimulation, zum Anderen dem Abknospen von einem endosomalen Zwischenprodukt mit Involvierung des AP3-Komplexes bei der sogenannten *bulk*-Endozytose in Folge einer stärkeren Stimulation (Faundez et al., 1998; Holt et al., 2003). Weiterhin kommt der *kiss-and-run*-Mechanismus der Exozytose zur Bereitstellung der Membranproteine nach Exozytose in Frage, in dessen Rahmen das Vesikel nicht komplett mit der Plasmamembran verschmilzt, sondern nur passager eine Fusionspore zur Ausschüttung des Vesikelinhalts ausbildet und somit die Vesikelmembranproteine im Wesentlichen im Vesikel verbleiben (Ceccarelli et al., 1973; Harata et al., 2006). Als Endozytosesignale gelten im Allgemeinen die Interaktionen von Untereinheiten des AP2-Komplexes, welcher an Clathrin bindet, mit verschiedenen Motiven in den entsprechenden Proteinen wie z.B. den sogenannten Di-Leucin-Motiven oder Tyrosin

basierten-Motiven (Maycox et al., 1992; Letourneur and Klausner, 1992; Trowbridge et al., 1993). Es finden sich bisher jedoch keine zu den genannten Motiven homologen Bereiche als mögliche Sortierungssignale in den VAMPs (Traub, 2009). Von Grote und Mitarbeitern wurde nachgewiesen, dass die Sortierung von VAMP-2 in Vesikel durch bestimmte zytoplasmatische Aminosäuresequenzen zustande kommt, die auch für die Bindung an den t-SNARE notwendig sind und gleichzeitig die Endozytose ermöglichen (Grote et al., 1995; Grote and Kelly, 1996). Es konnte auch gezeigt werden, dass vesikuläre Proteine, wie VAMP und Synaptotagmin, nach Exozytose der Vesikel an der Plasmamembran nicht identisch sind mit den nachfolgend mittels Endozytose einverleibten Molekülen (Wienisch and Klingauf, 2006); vielmehr werden diese vesikulären Proteine aus einem großen Pool auf der Plasmamembran rekrutiert, in welchem sie typischerweise in einer viel höheren Konzentration vorliegen als z.B. im Vesikel selbst (Fernandez-Alfonso et al., 2006), so dass Endozytose und Exozytose voneinander unabhängig ablaufen können (Taubenblatt et al., 1999; Dittman and Kaplan, 2006). Insofern ist anzumerken, dass eine Überexpression des VAMP-Proteins z.B. durch Transfektion möglicherweise einer Fehlsortierung entsprechend zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten des intrazellulären Pools führt und damit theoretisch das Fluoreszenzmuster des endozytierten Anteils, der mit Endosomen kolokalisiert, verfälschen könnte (Grote and Kelly, 1996). Andere Gruppen konnten jedoch auch beobachten, dass nach Transfektion das Verhältnis von intrazellulärem und auf der Plasmamembran befindlichem VAMP-Protein im Wesentlichen vergleichbar ist mit dem Verhältnis bei endogener Expression dieses v-SNAREs (Wienisch and Klingauf, 2006; Fernandez-Alfonso et al., 2006; Dittman and Kaplan, 2006). Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ist auch nicht auszuschließen, dass der N-terminal gelegene GFP- bzw. RFP-*tag* die normale Funktion der jeweiligen VAMP-1 Isoform beeinflussen könnte. Obwohl man daher die Daten bezüglich der subzellulären Lokalisation beider Isoformen mit entsprechender Vorsicht interpretieren muss, so konnten andere Gruppen zuvor zeigen, dass die N-terminale Markierung von VAMP-Isoformen keinen Einfluss auf die Sortierung bzw. Interaktion mit ihren SNARE-Partnern zu haben scheint (Isenmann et al., 1998; Takuma et al., 2002).

Wenn man davon ausgeht, dass spezielle Sortierungsproteine für die Endozytose des VAMP und Sortierung zu den Endosomen eine Rolle spielen, und nicht ein

universales zelltypunabhängiges Endozytose-Signal existiert, könnte auch das Zellsystem, in dem das Vesikelverhalten untersucht wird von Bedeutung sein, weil sich die Endozytose-Maschinerie, speziell zur Vesikelbiogenese, in verschiedenen Zelltypen möglicherweise unterscheidet (Grote and Kelly, 1996). Die Tatsache, dass die unterschiedlichen Isoformen nicht in allen Zelllinien einzeln oder auch parallel nativ exprimiert werden, kann ebenfalls Einflüsse auf Ergebnisse haben. Denkbar ist z.B. eine kompetitive Hemmung bzw. Ersatz bestimmter Funktionen durch die jeweils andere koexprimierte Isoform, die in natürlichen Abläufen ohne Transfektion nicht vorkäme.

VAMP-2 konnte eine wichtige Rolle für die Produktion von synaptischen Vesikeln aus Endosomen zugewiesen werden, was über den Adaptor-Komplex AP3 vermittelt wird (Salem et al., 1998). In Hefe führt der Funktionsverlust des VAMP-Homologs Snc-1p zur Störung der Endozytose (Gurunathan et al., 2000). Experimentell konnte gezeigt werden, dass bei VAMP-2-*knockout* nicht die Anzahl der an der Plasmamembran gedockten Vesikel oder die Größe der aktiven Zone der Synapse beeinflusst wird, sondern lediglich die Größe und Form der Vesikel gegenüber dem Wildtyp alteriert ist, was auf einen Defekt in der Endozytose-abhängigen Bereitstellung der Vesikel an der Plasmamembran hinweist (Deak et al., 2004). Weiterhin ist die Wiederherstellung des sogenannten *ready-releasable*-Pools von Vesikeln, die an der Synapse zur Ausschüttung bereit stehen und entweder aus dem Reservepool von Vesikeln stammen oder aus Abschnürungen der Plasmamembran neu entstehen, um das Dreifache verzögert (Pyle et al., 2000; Sara et al., 2002). Von Deak und Mitarbeitern wurde bereits die Hypothese geäußert, dass durch Verlust von VAMP-2 vor allem die schnelle Endozytose beeinträchtigt wird (Deak et al., 2004), während Synaptotagmin über Interaktionen mit Clathrin-Coats die langsame Endozytose ermöglicht (von Poser et al., 2000). Hierfür könnte ein Ausfall eines schnellen *kiss-and-run*-Mechanismus mit Übergang zur konventionellen Clathrin-vermittelten Endozytose ursächlich sein (Deak et al., 2004). Obwohl bisher keine Studien zur Untersuchung des Endozytose-Verhaltens von VAMP-1 vorliegen, sollten sich die Überlegungen auf diese Isoform ebenfalls übertragen lassen.

In 2010 wurde von Ngatchou postuliert, dass der extreme C-Terminus von VAMP-2 eine kritische Rolle für die Ausbildung der Fusionspore bei Membranverschmelzungen spielt und somit die physikalische Grundlage der Vesikelfunktion bildet (Ngatchou et al., 2010). So wird die Calcium-abhängige

Dynamik der Fusionsporenöffnung in erster Linie durch v-SNAREs beeinflusst (Borisovska et al., 2005; Stenovec et al., 2013). Abhängig von der Phospholipidzusammensetzung mit entsprechender Ladung und Oberflächenspannung der umgebenden Membran reagiert VAMP-1 in seiner Struktur und Orientierung in der Membran, wobei hierfür in der Interaktion seine juxtamembranäre Domäne ausschlaggebend ist und somit anzunehmend auch der intravesikuläre C-Terminus (Yassine et al., 2010). Durch Hinzufügen zweier polarer Aminosäurereste am äußersten intravesikulären C-Terminus kann die Fusion deutlich inhibiert werden, da die Einziehung der intravesikulären Reste in die Membran gestört wird, die zur Initiation der Fusion über eine Kontinuitätsunterbrechung der Membranen notwendig ist (Lindau et al., 2012). Interessanterweise weist auch die VAMP-1b Isoform im Gegensatz zu VAMP-1a zwei polare Reste C-terminal auf (-SKYR).

Wenn man davon ausgeht, dass die Schnelligkeit einer Öffnung der Fusionspore im Zusammenhang mit Aminosäureresten in der Nähe der Transmembrandomäne reguliert werden kann (Han et al., 2004; Ngatchou et al., 2010) und sich in verschiedenen VAMP-Isoformen unterscheidet, liegt es nahe, dass diese verschiedenen Isoformen mit eher langsamen (Clathrin-vermittelten) Fusionsvorgängen oder auch schnelleren Mechanismen (*Kiss-and-run* oder *Bulk-Endozytose*) verknüpft sein können (Vardjan et al., 2007). So wird z.B. durch Verlust von AP3 in *knock-out*-Mäusen (sogenannten Mocha-Mäusen) VAMP-7 (Toxin-insensitives VAMP) in einem frühen endosomalen Kompartiment retiniert (Martinez-Arca et al., 2003), was die spontane Transmitterfreisetzung verstärkt, während die stimulierte Transmitterfreisetzung reduziert ist (Scheuber et al., 2006). Die Zelle ist ausgestattet mit mindestens zwei verschiedenen Vesikelpools, die in ihrer molekularen Zusammensetzung, auch bezüglich der vorherrschenden VAMP-Isoform, differieren (Hua et al., 2011) und könnte somit über Regulierung der Expression der Isoformen auch den Ablauf von konstitutiven (langsamen) Exo- bzw. Endozytose-Vorgängen *versus* stimulus-abhängigen (schnellen) Vorgängen bevorzugen. Ein Beispiel konnte auch eine weitere Untersuchung aus 2012 liefern, die zeigte, wie durch den Einsatz der verschiedenen Isoformen VAMP-4 und VAMP-2 innerhalb der Nervenzelle eine funktionelle Trennung, mit voneinander unabhängigen subzellulären Transportwegen, geschaffen wird zwischen schneller Calcium-abhängiger Neurotransmitterfreisetzung und der langsamen konstitutiven



Exozytose (Raingo et al., 2012). Allerdings sind die Variablen, welche die Zelle zur Auswahl des vorherrschenden Endo- bzw. Exozytose-Mechanismus befähigen, bislang nicht bekannt (Smith et al., 2008).

#### 4.5 Hinweise auf homotypische Fusion

Gemäß der SNARE-Hypothese braucht jede Membran zur Fusion einen SNARE, der eine Transmembrandomäne enthält, und in der konstitutiven Exozytose in Neuronen ist definiert, dass der jeweilige v-SNARE auf der Vesikelmembran als Donorkompartiment lokalisiert ist, während ein t-SNARE mit dem Akzeptor-Kompartiment assoziiert ist (Fasshauer et al., 1998; Bock et al., 2001). Bei der intrazellulären Fusion mit verschiedenen unter Umständen weit verteilten Recycling-Kreisläufen ist jedoch schwerer zu unterscheiden, wo einzelne Vesikelmembranproteine ihre Funktion innehaben und wo sie nur auf der Durchreise sind. Speziell homotypische Fusion, das heißt, Fusion funktionell und strukturell gleicher Kompartimente bzw. Vesikelpopulationen untereinander, sollte bezüglich Sortierung und Recycling genau reguliert sein (Zwilling et al., 2007).

Für den Transport von endozytiertem Material von frühen Endosomen bis zum Lysosom müssen sequentiell bestimmte Transportschritte durchlaufen werden, wobei homotypische Fusionsprozesse auf Ebene der frühen Endosomen wie auch der späten Endosomen vorkommt (Antonin et al., 2000). Unter anderem ist im letzten Schritt experimentell eine direkte Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen ebenso möglich wie ein *kissing* mit Abgabe des Inhalts und Aufrechterhaltung beider Organellen (Luzio et al., 2009). Die Regulation eines intrazellulären Fusionsvorganges durch Variierung einer bestimmten VAMP-Isoform zeigt sich anhand des Austausches von VAMP-7 und VAMP-8 im SNARE-Komplex: Im Komplex mit Syntaxin 7, Vti1b und Syntaxin 8 findet eine heterotypische Fusion von späten endosomalen Vesikeln und Lysosomen statt, wenn VAMP-7 in der Lysosomenmembran enthalten ist. Derselbe Komplex von t-SNAREs aus Vti1b und Syntaxin 8 kann dagegen eine homotypische Fusion zwischen späten Endosomen untereinander unterstützen, wenn stattdessen VAMP-8 in der Vesikelmembran eingesetzt wird (Pryor et al., 2004). So scheint es möglich, dass von der Zelle eine Spezifität der Vesikeltransportvorgänge durch verschiedene VAMP-Isoformen hergestellt wird, indem die Zusammensetzung des jeweiligen SNARE-Komplexes variiert.

Die TIRF-Mikroskopie hat in unseren Experimenten gezeigt, dass es auch in

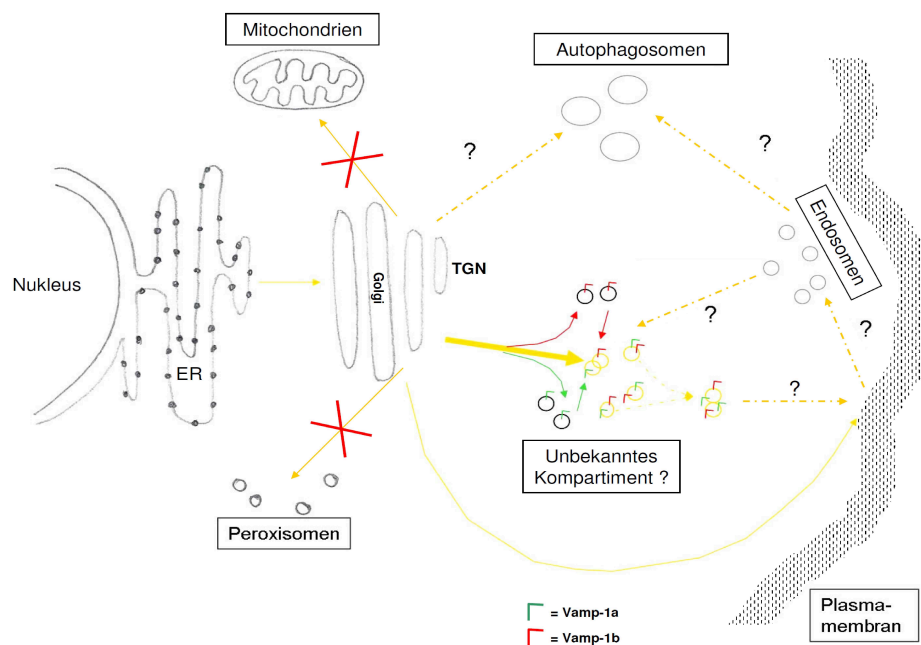
transfizierten COS-7 Zellen gleichartige Vesikel gibt, die beide VAMP-1 Isoformen enthalten und miteinander fusionieren, somit möglicherweise dem späten endosomalen bzw. lysosomalen Kompartiment zuzuordnen sind. Gleichzeitig existieren einzelne Vesikel, die lediglich eine der beiden Isoformen enthalten, miteinander über einen *kissing*-Mechanismus in Verbindung zu stehen scheinen und dabei ihre ursprüngliche Zusammensetzung weitestgehend aufrechterhalten.

Obwohl eine Funktion von VAMP-1 für die Vesikelfusion in diesem Zusammenhang bisher nicht beschrieben wurde, ist sie nicht ausgeschlossen, da bereits verschiedene VAMP-Isoformen entsprechenden Kompartimenten zugeordnet werden konnten. In einem solchen intrazellulären Kontext ist beispielsweise VAMP-8 (Endobrevin) zu nennen, welches aufgrund der Kollokalisierung mit dem Transferrin-Rezeptor als Marker des frühen und späten Endosoms eine ubiquitäre Funktion im endosomalen Recycling-Kompartiment zugewiesen wird (Wong et al., 1998; Advani et al., 1998). Der *knock-out* von VAMP-8 durch Einsatz von spezifischen siRNAs führt speziell zu einem Ausfall der Fusion zwischen Lysosomen und endogenen Autophagosomen sowie auch bakteriellen Xenophagosomen, was für den *knock-out* von VAMP-7 nicht zutrifft (Furuta et al., 2010). VAMP-7 (TI(toxin-insensitives)-VAMP) wie auch VAMP-8 scheinen in dem Zusammenhang beide eindeutig in der Lysosomenmembran lokalisiert zu sein (Advani et al., 1999; Furuta et al., 2010). Gleichzeitig ist VAMP-7 zusammen mit SNAP-23 und Syntaxin-4 beteiligt an konstitutiven sowie an stimulierten Exozytose-Vorgängen, die zum Großteil nicht durch Neurotoxine gestört werden, daher auch die Bezeichnung toxin-insensitives VAMP (Lafont et al., 1999). Obwohl zum Beispiel *in vitro* Komplexe von VAMP-3 mit endosomalen SNAREs vorkommen (Fasshauer et al., 1999) und Liposomen-Fusion möglich ist (Brandhorst et al., 2006), spielt VAMP-3 *in vivo* scheinbar keine Rolle bei der Fusion früher Endosomen (Link et al., 1993). Es könnte daher *in vivo* die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der einzelnen SNAREs ausschlaggebend für die zustande kommenden Komplexbildungen sein (Parlati et al., 2000). Auch bei *in vitro* Studien nicht berücksichtigte Regulationsfaktoren wie Rab-Proteine und *Tethering*-Faktoren sowie Transmembrandomänen der SNAREs könnten eine größere Rolle spielen, die diese Lokalisation beeinflussen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an GFP- bzw. RFP-markierten VAMP-1a und -1b Isoformen konnte die subzelluläre Lokalisation näher eingrenzen (Abbildung 4.1). Eine definitive

Zuordnung zu verschiedenen subzellulären Kompartimenten im späten sekretorischen Transportweg ist jedoch aufgrund einer weitreichenden möglichen Kolo-kalisation nicht abschließend möglich. Das Fehlen einer Sortierung beider Isoformen zu Mitochondrien sowie Peroxisomen war deutlich darstellbar.

In nachfolgenden Untersuchungen ist es daher notwendig, über weiterführende biochemische und zellbiologische Untersuchungen, z.B. mittels subzellulärer Fraktionierung verschiedener Vesikelpopulationen die Vesikelpopulationen zu identifizieren und zu charakterisieren, die bevorzugt eine der beiden VAMP-1 Isoformen aufweisen, um so Rückschlüsse auf Unterschiede in der Funktion beider Isoformen zu erhalten.



**Abbildung 4.1 Zusammenfassendes Modell zur subzellulären Sortierung der VAMP-1a und -1b Isoformen.** Dargestellt sind die verschiedenen Zellorganellen bzw. Zellkompartimente und der Transportweg, den VAMP-haltige Vesikel auf ihrem Weg vom Endoplasmatischen Retikulum bis zur Zielorganelle durchlaufen. Dabei sind die Pfade zu Kompartimenten, die von beiden VAMP-1 Isoformen erreicht werden, mit gelben Pfeilen markiert. Gemäß der Untersuchungsergebnisse sortiert keine der Isoformen zu Mitochondrien oder Peroxisomen (in rot durchgestrichen). Weitere denkbare Sortierungswege, die anhand der Ergebnisse nicht eindeutig bestätigt oder ausgeschlossen werden konnten, sind mit gestrichelten Linien und einem Fragezeichen hervorgehoben. Ein bislang unbekanntes bzw. unbezeichnetes Kompartiment ist möglicherweise der Ausgangspunkt für Vesikel, die nach Sortierung im TGN nur eine oder auch beide der VAMP-1 Isoformen enthalten, untereinander fusionieren können und mit Endosomen in Verbindung stehen.

## 5. Zusammenfassung

Die sogenannten SNARE (**s**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive factor **a**ttachment protein **r**eceptor) - Proteine sind essentielle Bestandteile der zellulären Transportmaschinerie und maßgeblich beteiligt an Membranfusionsprozessen, wie z.B. der Fusion zwischen einem Transportvesikel- und seiner Zielmembran. Bei dem auf Transportvesikeln befindlichen vesikulären (v)-SNARE-Protein VAMP-1 (**v**esicle-**a**ssociated **m**embrane **p**rotein-1) handelt es sich um ein Typ II - Membranprotein, welches aus einem dominanten N-terminalen zytosolischen, einem transmembranen sowie einem kurzen intraluminalen C-Terminus besteht. Es konnte auch für Säugetierzellen gezeigt werden, dass der Mechanismus des alternativen RNA Spleißens zu einer Erhöhung der Zahl verschiedener VAMP-Isoformen beiträgt. Dieser Mechanismus wurde erstmals für das VAMP-1 Gen der Ratte beschrieben, wobei zwei verschiedene in Geweben differentiell exprimierte VAMP-1 Isoformen, VAMP-1a und -1b, identifiziert werden konnten. Die neu charakterisierte VAMP-1b Isoform unterschied sich von der bekannten VAMP-1a Isoform ausschließlich am C-terminalen, intraluminalen Ende und zeigte eine dominante Expression in nicht-neuronalen, insbesondere sekretorisch-aktiven, Geweben wie der Glandula Parotis, wohingegen die bekannte VAMP-1a Isoform eine vorherrschende Expression im Zentralnervensystem aufwies. Ebenfalls wurde berichtet, dass eine ähnliche humane VAMP-1 Spleiß-Isoform, welche ebenfalls eine Veränderung am intraluminalen C-Terminus aufwies, zu Mitochondrien sortierte, was darauf hinweist, dass es sich bei dem C-terminalen Anteil dieser SNARE-Proteine möglicherweise um ein Sortierungssignal handelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, über einen zellbiologischen Ansatz und Nutzung fluoreszenzmikroskopischer Methoden zu untersuchen, ob bei Vergleich beider VAMP-1 Isoformen Unterschiede in der subzellulären Lokalisation nachzuweisen sind, da dies auf eine Rolle des intraluminalen C-Terminus für die Sortierung beider Isoformen in verschiedene subzelluläre Kompartimente hinweisen würde. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden mittels PCR-Klonierung N-terminal GFP- und RFP-markierte VAMP-1a (GFP- und RFP-V1a) und VAMP-1b (GFP- und RFP-V1b) Expressionskonstrukte hergestellt. Diese Konstrukte wurden jeweils als Kombination eines RFP-markierten und GFP-markierten VAMP-1 Konstrukts in HeLa-Zellen kotransfiziert und die subzelluläre Lokalisation der exprimierten Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Es zeigten sich in Bereichen, welche dem

Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat entsprechen, eine deutliche Kolokalisation beider Isoformen. Da VAMP Proteine nach Synthese zunächst in die Membranen des ER integriert werden und Unterschiede der Lokalisation erst nach Sortierung im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zustande kommen, war dies zu erwarten, zumal VAMP-1 erst im Bereich des späten sekretorischen Transportwegs funktionell eine Rolle spielt. Peripher zeigten sich jedoch zunehmend auch vesikuläre Strukturen, welche nur eine der beiden Isoformen aufzuweisen schienen. Um die Kolokalisation beider Proteine auch in nicht-fixierten vitalen Zellen zu beurteilen, wurde die Methode der TIRF (*total internal reflection fluorescence*)-Mikroskopie eingesetzt. Hierzu wurden die Konstrukte in COS-7 Zellen exprimiert, da diese in besonderem Maße für die TIRF-Mikroskopie geeignet sind und eine gute Expression der fluoreszierenden Proteine erlauben. Ähnlich wie zuvor in HeLa-Zellen beschrieben, so wurden auch hier vesikuläre Strukturen beobachtet, welche bevorzugt nur eine der beiden Isoformen exprimierten. Ebenfalls fanden sich Hinweise auf das Vorkommen homotypischer Fusionen zwischen Vesikeln, die sowohl VAMP-1a als auch VAMP-1b exprimierten. Um eine mögliche Lokalisation der zwei VAMP-1 Isoformen in definierten zellulären Kompartimenten des späten sekretorischen Transportweges zu untersuchen, erfolgte eine Transfektion von HeLa-Zellen mit GFP-V1a oder GFP-V1b, sowie nachfolgende Immunzytochemie mit einem Antikörper gegen ein Markerprotein für Mitochondrien (TOM20), frühe Endosomen (EEA1), Lysosomen (LAMP-3) sowie Autophagosomen (MAP LC3beta) bzw. eine Koexpression von RFP-V1a oder RFP-V1b mit dem peroxisomalen Markerprotein GFP-SKL. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich keine Hinweise für eine Sortierung beider VAMP-1 Isoformen zu Mitochondrien oder Peroxisomen. Beide Isoformen waren jedoch vereinzelt in mit frühen Endosomen, Lysosomen sowie Autophagosomen assoziierten Vesikeln nachweisbar. Aufgrund der Beobachtung vesikulärer Strukturen, welche nur eine der transfizierten VAMP-1 Isoformen aufzuweisen scheinen, ist es daher möglich, dass nur eine der beiden Isoformen in ein noch nicht näher definiertes Kompartiment sortiert. Weiterführende Untersuchungen, die andere Methoden, wie z.B. subzelluläre Fraktionierung, einsetzen, könnten dazu beitragen, diese Kompartimente näher zu definieren.

## 6. Summary

The so-called SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteins are essential constituents of the intracellular trafficking machinery and are primarily involved in membrane fusion processes such as fusion of a transport vesicle with its cognate target membrane. The v-SNARE protein VAMP-1 (vesicle associated membrane protein 1) that is found in transport vesicle membranes is a so-called type II membrane protein consisting of a dominant N-terminal cytosolic, a transmembrane and a short intraluminal C-terminal domain. The mechanism of alternative RNA-splicing that contributes to the existence of different VAMP isoforms could also be found in mammalian cells. This mechanism was demonstrated for the first time for the VAMP-1 gene of the rat describing two differentially expressed VAMP-1 isoforms termed VAMP-1a and VAMP-1b. The newly identified VAMP-1b isoform differed from the known VAMP-1a isoform in its C-terminal intraluminal end and was mainly expressed in nonneuronal particularly secretory active tissues such as the parotid gland, whereas the known VAMP-1a isoform exhibited a primary distribution in the central nervous system. In addition, it was reported that a similar human VAMP-1 splice isoform exhibiting a variable intraluminal C-terminal end was sorted to mitochondria, pointing to the C-terminal end of these SNARE proteins to potentially act as sorting signals.

The aim of the present study was to evaluate if both VAMP-1 isoforms differ in their subcellular localization by using a cell biological approach involving fluorescence microscopy since this could point to a role of the intraluminal C-terminal end for sorting of both isoforms to different subcellular compartments. To approach these questions GFP and RFP labelled VAMP-1a (GFP- and RFP-V1a) and VAMP-1b (GFP- and RFP-V1b) expression constructs were generated by PCR cloning and were cotransfected into HeLa cells with subsequent evaluation of the protein's subcellular localization using fluorescence microscopy. Regions consistent with the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus demonstrated a clear overlap of both signals. Since VAMP proteins are integrated into membranes of the ER after synthesis, and differences in the localization are expected to occur after sorting in the trans-Golgi network (TGN), this was an expected finding, in particular since VAMP-1 should play a role in the late secretory pathway. In the periphery of the cells, vesicular structures could be observed which seemed to express only one of both isoforms when coexpressed (GFP-V1a/RFP-V1b or GFP-V1b/RFP-V1a). To evaluate

colocalization of both proteins in non-fixed vital cells, the method of total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF) was implemented. For this, the respective constructs were expressed in COS-7 cells, since these were particularly suitable for TIRF microscopy, demonstrating good expression of the fluorescent proteins. Similarly as observed in HeLa cells, vesicular structures could also be seen that primarily expressed one of both isoforms. In addition, evidence for homotypic fusion events was found between vesicles that coexpressed VAMP-1a as well as VAMP-1b. To evaluate a possible localization of the two isoforms in compartments of the late secretory pathway, GFP-V1a or GFP-V1b were transfected into HeLa cells and subsequent immunocytochemistry was performed, using antibodies directed against marker proteins specific for mitochondria (TOM20), early endosomes (EEA1), lysosomes (LAMP-3) and autophagosomes (MAP LC3beta), as well as coexpression of RFP-V1a or RFP-V1b with the peroxisomal marker protein GFP-SKL.

Taken together, no evidence was found for sorting of both VAMP-1 isoforms to mitochondria or peroxisomes. However, both isoforms were found to be expressed in a minor subset of singular vesicles that appeared associated with the early endosomal, lysosomal and autophagosomal compartment. Since vesicular structures were observed that expressed only one of the two transfected VAMP-1 isoforms, it is possible that only one of both isoforms is sorted to a yet unidentified compartment. Subsequent studies, using other methods such as subcellular fractionation, could help to further define these compartments.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Advani, R.J., H.R.Bae, J.B.Bock, D.S.Chao, Y.C.Doung, R.Prekeris, J.S.Yoo, and R.H.Scheller. 1998. Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. *J. Biol. Chem.* 273:10317-10324.
2. Advani, R.J., B.Yang, R.Prekeris, K.C.Lee, J.Klumperman, and R.H.Scheller. 1999. VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes. *J. Cell Biol.* 146:765-776.
3. Allersma, M.W., L.Wang, D.Axelrod, and R.W.Holz. 2004. Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy. *Mol. Biol. Cell* 15:4658-4668.
4. Antonin, W., D.Fasshauer, S.Becker, R.Jahn, and T.R.Schneider. 2002. Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat. Struct. Biol.* 9:107-111.
5. Antonin, W., C.Holroyd, R.Tikkanen, S.Honing, and R.Jahn. 2000. The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol. Biol. Cell* 11:3289-3298.
6. Archer, B.T., III, T.Ozcelik, R.Jahn, U.Francke, and T.C.Sudhof. 1990. Structures and chromosomal localizations of two human genes encoding synaptobrevins 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 265:17267-17273.



7. Axelrod, D. 2008. Chapter 7: Total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.* 89:169-221.
8. Baird, G.S., D.A.Zacharias, and R.Y.Tsien. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:11984-11989.
9. Baumert, M., P.R.Maycox, F.Navone, C.P.De, and R.Jahn. 1989. Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J.* 8:379-384.
10. Bennett, M.K., J.E.Garcia-Arraras, L.A.Elferink, K.Peterson, A.M.Fleming, C.D.Hazuka, and R.H.Scheller. 1993. The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74:863-873.
11. Bennett, M.K. and R.H.Scheller. 1994. A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Annu. Rev. Biochem.* 63:63-100.
12. Bennett, M.K. and R.H.Scheller. 1993. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:2559-2563.
13. Berglund, L., H.J.Hoffmann, R.Dahl, and T.E.Petersen. 1999. VAMP-1 has a highly variable C-terminus generated by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264:777-780.

14. Bock, J.B., H.T.Matern, A.A.Peden, and R.H.Scheller. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409:839-841.
15. Bonifacino, J.S. and B.S.Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153-166.
16. Borgese, N., I.Gazzoni, M.Barberi, S.Colombo, and E.Pedrazzini. 2001. Targeting of a tail-anchored protein to endoplasmic reticulum and mitochondrial outer membrane by independent but competing pathways. *Mol. Biol. Cell* 12:2482-2496.
17. Borisovska, M., Y.Zhao, Y.Tsytsyura, N.Glyvuk, S.Takamori, U.Matti, J.Rettig, T.Sudhof, and D.Bruns. 2005. v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J.* 24:2114-2126.
18. Bourassa, C.V., I.A.Meijer, N.D.Merner, K.K.Grewal, M.G.Stefanelli, K.Hodgkinson, E.J.Ives, W.Pryse-Phillips, M.Jog, K.Boycott, D.A.Grimes, S.Goobie, R.Leckey, P.A.Dion, and G.A.Rouleau. 2012. VAMP1 mutation causes dominant hereditary spastic ataxia in Newfoundland families. *Am. J. Hum. Genet.* 91:548-552.
19. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

20. Brandhorst, D., D.Zwilling, S.O.Rizzoli, U.Lippert, T.Lang, and R.Jahn. 2006. Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:2701-2706.
  
21. Braun, J.E., B.A.Fritz, S.M.Wong, and A.W.Lowe. 1994. Identification of a vesicle-associated membrane protein (VAMP)-like membrane protein in zymogen granules of the rat exocrine pancreas. *J. Biol. Chem.* 269:5328-5335.
  
22. Bulbarelli, A., T.Sprocati, M.Barberi, E.Pedrazzini, and N.Borgese. 2002. Trafficking of tail-anchored proteins: transport from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and sorting between surface domains in polarised epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115:1689-1702.
  
23. Cameron, P.L., T.C.Sudhof, R.Jahn, and C.P.De. 1991. Colocalization of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis. *J. Cell Biol.* 115:151-164.
  
24. Ceccarelli, B., W.P.Hurlbut, and A.Mauro. 1973. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57:499-524.
  
25. Chapman, E.R., S.An, N.Barton, and R.Jahn. 1994. SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J. Biol. Chem.* 269:27427-27432.

26. Chen, M. and J.L.Manley. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:741-754.
27. Chen, Y.A. and R.H.Scheller. 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:98-106.
28. Chilcote, T.J., T.Galli, O.Mundigl, L.Edelmann, P.S.McPherson, K.Takei, and C.P.De. 1995. Cellubrevin and synaptobrevins: similar subcellular localization and biochemical properties in PC12 cells. *J. Cell Biol.* 129:219-231.
29. Chin, A.C., R.W.Burgess, B.R.Wong, T.L.Schwarz, and R.H.Scheller. 1993. Differential expression of transcripts from syb, a *Drosophila melanogaster* gene encoding VAMP (synaptobrevin) that is abundant in non-neuronal cells. *Gene* 131:175-181.
30. Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16:10881-10890.
31. De, S.M., A.D'Arrigo, and N.Borgese. 1995. The targeting information of the mitochondrial outer membrane isoform of cytochrome b5 is contained within the carboxyl-terminal region. *FEBS Lett.* 370:69-74.
32. Deak, F., S.Schoch, X.Liu, T.C.Sudhof, and E.T.Kavalali. 2004. Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 6:1102-1108.

33. Deitcher, D.L., A.Ueda, B.A.Stewart, R.W.Burgess, Y.Kidokoro, and T.L.Schwarz. 1998. Distinct requirements for evoked and spontaneous release of neurotransmitter are revealed by mutations in the *Drosophila* gene neuronal-synaptobrevin. *J. Neurosci.* 18:2028-2039.
34. Delille, H.K., B.Agricola, S.C.Guimaraes, H.Borta, G.H.Luers, M.Fransen, and M.Schrader. 2010. Pex11 $\beta$ -mediated growth and division of mammalian peroxisomes follows a maturation pathway. *J. Cell Sci.* 123:2750-2762.
35. DiAntonio, A., R.W.Burgess, A.C.Chin, D.L.Deitcher, R.H.Scheller, and T.L.Schwarz. 1993. Identification and characterization of *Drosophila* genes for synaptic vesicle proteins. *J. Neurosci.* 13:4924-4935.
36. Dittman, J.S. and J.M.Kaplan. 2006. Factors regulating the abundance and localization of synaptobrevin in the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:11399-11404.
37. Dumas, J.J., E.Merithew, E.Sudharshan, D.Rajamani, S.Hayes, D.Lawe, S.Corvera, and D.G.Lambright. 2001. Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol. Cell* 8:947-958.
38. Elferink, L.A., W.S.Trimble, and R.H.Scheller. 1989. Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *J. Biol. Chem.* 264:11061-11064.
39. Elgersma, Y., L.Kwast, B.M.van den, W.B.Snyder, B.Distel, S.Subramani, and H.F.Tabak. 1997. Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal

- integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 16:7326-7341.
40. Eskelinen, E.L. 2006. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Aspects Med.* 27:495-502.
41. Fasshauer, D., W.Antonin, M.Margittai, S.Pabst, and R.Jahn. 1999. Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J. Biol. Chem.* 274:15440-15446.
42. Fasshauer, D., R.B.Sutton, A.T.Brunger, and R.Jahn. 1998. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:15781-15786.
43. Fatt, P. and B.Katz. 1952. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol* 117:109-128.
44. Faundez, V., J.T.Horng, and R.B.Kelly. 1998. A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* 93:423-432.
45. Fei, G., C.Guo, H.S.Sun, and Z.P.Feng. 2007. Chronic hypoxia stress-induced differential modulation of heat-shock protein 70 and presynaptic proteins. *J. Neurochem.* 100:50-61.

46. Fernandez-Alfonso, T., R.Kwan, and T.A.Ryan. 2006. Synaptic vesicles interchange their membrane proteins with a large surface reservoir during recycling. *Neuron* 51:179-186.
47. Friedland, D.R., R.Eernisse, and P.Popper. 2008. Identification of a novel Vamp1 splice variant in the cochlear nucleus. *Hear. Res.* 243:105-112.
48. Furuta, N., N.Fujita, T.Noda, T.Yoshimori, and A.Amano. 2010. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol. Biol. Cell* 21:1001-1010.
49. Gaisano, H.Y., L.Sheu, G.Grondin, M.Ghai, A.Bouquillon, A.Lowe, A.Beaudoin, and W.S.Trimble. 1996. The vesicle-associated membrane protein family of proteins in rat pancreatic and parotid acinar cells. *Gastroenterology* 111:1661-1669.
50. Gerst, J.E. 1999. SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell Mol. Life Sci.* 55:707-734.
51. Gerst, J.E. 1997. Conserved alpha-helical segments on yeast homologs of the synaptobrevin/VAMP family of v-SNAREs mediate exocytic function. *J. Biol. Chem.* 272:16591-16598.
52. Gerst, J.E., L.Rodgers, M.Riggs, and M.Wigler. 1992. SNC1, a yeast homolog of the synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin gene

- family: genetic interactions with the RAS and CAP genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:4338-4342.
53. Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
54. Gough, N.R., M.E.Zweifel, O.Martinez-Augustin, R.C.Aguilar, J.S.Bonifacino, and D.M.Fambrough. 1999. Utilization of the indirect lysosome targeting pathway by lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) is influenced largely by the C-terminal residue of their GYXXphi targeting signals. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 23):4257-4269.
55. Grote, E., M.Baba, Y.Ohsumi, and P.J.Novick. 2000. Geranylgeranylated SNAREs are dominant inhibitors of membrane fusion. *J. Cell Biol.* 151:453-466.
56. Grote, E., J.C.Hao, M.K.Bennett, and R.B.Kelly. 1995. A targeting signal in VAMP regulating transport to synaptic vesicles. *Cell* 81:581-589.
57. Grote, E. and R.B.Kelly. 1996. Endocytosis of VAMP is facilitated by a synaptic vesicle targeting signal. *J. Cell Biol.* 132:537-547.
58. Groves, J.T., R.Parthasarathy, and M.B.Forstner. 2008. Fluorescence imaging of membrane dynamics. *Annu. Rev. Biomed. Eng* 10:311-338.
59. Gurunathan, S., D.Chapman-Shimshoni, S.Trajkovic, and J.E.Gerst. 2000. Yeast exocytic v-SNAREs confer endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 11:3629-3643.



60. Han, X., C.T.Wang, J.Bai, E.R.Chapman, and M.B.Jackson. 2004. Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Science* 304:289-292.
61. Hanson, P.I., J.E.Heuser, and R.Jahn. 1997. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:310-315.
62. Harata, N.C., A.M.Aravanis, and R.W.Tsien. 2006. Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J. Neurochem.* 97:1546-1570.
63. Heuser, J.E. and T.S.Reese. 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57:315-344.
64. Hofmann, M.W., K.Peplowska, J.Rohde, B.C.Poschner, C.Ungermann, and D.Langosch. 2006. Self-interaction of a SNARE transmembrane domain promotes the hemifusion-to-fusion transition. *J. Mol. Biol.* 364:1048-1060.
65. Holt, M., A.Cooke, M.M.Wu, and L.Lagnado. 2003. Bulk membrane retrieval in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J. Neurosci.* 23:1329-1339.
66. Hua, S.Y. and M.P.Charlton. 1999. Activity-dependent changes in partial VAMP complexes during neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.* 2:1078-1083.

67. Hua, Z., S.Leal-Ortiz, S.M.Foss, C.L.Waites, C.C.Garner, S.M.Voglmaier, and R.H.Edwards. 2011. v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. *Neuron* 71:474-487.
68. Ibaraki, K., H.P.Horikawa, T.Morita, H.Mori, K.Sakimura, M.Mishina, H.Saisu, and T.Abe. 1995. Identification of four different forms of syntaxin 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211:997-1005.
69. Isenmann, S., Y.Khew-Goodall, J.Gamble, M.Vadas, and B.W.Wattenberg. 1998. A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal. *Mol. Biol. Cell* 9:1649-1660.
70. Jagadish, M.N., J.T.Tellam, S.L.Macaulay, K.H.Gough, D.E.James, and C.W.Ward. 1997. Novel isoform of syntaxin 1 is expressed in mammalian cells. *Biochem. J.* 321 ( Pt 1):151-156.
71. Jahn, R., T.Lang, and T.C.Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
72. Jahn, R. and R.H.Scheller. 2006. SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:631-643.
73. Kabeya, Y., N.Mizushima, T.Ueno, A.Yamamoto, T.Kirisako, T.Noda, E.Kominami, Y.Ohsumi, and T.Yoshimori. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19:5720-5728.

74. Kasai, K. and K.Akagawa. 2001. Roles of the cytoplasmic and transmembrane domains of syntaxins in intracellular localization and trafficking. *J. Cell Sci.* 114:3115-3124.
75. Klionsky, D.J. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118:7-18.
76. Kutay, U., G.hnert-Hilger, E.Hartmann, B.Wiedenmann, and T.A.Rapoport. 1995. Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 14:217-223.
77. Kyte, J. and R.F.Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
78. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
79. Lafont, F., P.Verkaide, T.Galli, C.Wimmer, D.Louvard, and K.Simons. 1999. Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:3734-3738.
80. Lazova, R., R.L.Camp, V.Klump, S.F.Siddiqui, R.K.Amaravadi, and J.M.Pawelek. 2012. Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clin. Cancer Res.* 18:370-379.

81. Letourneur, F. and R.D.Klausner. 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-1157.
82. Leube, R.E., P.Kaiser, A.Seiter, R.Zimbelmann, W.W.Franke, H.Rehm, P.Knaus, P.Prior, H.Betz, H.Reinke, and . 1987. Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *EMBO J.* 6:3261-3268.
83. Li, Q., J.A.Lee, and D.L.Black. 2007. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:819-831.
84. Lin, R.C. and R.H.Scheller. 1997. Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* 19:1087-1094.
85. Lindau, M., B.A.Hall, A.Chetwynd, O.Beckstein, and M.S.Sansom. 2012. Coarse-grain simulations reveal movement of the synaptobrevin C-terminus in response to piconewton forces. *Biophys. J.* 103:959-969.
86. Link, E., H.McMahon, M.G.Fischer von, S.Yamasaki, H.Niemann, T.C.Sudhof, and R.Jahn. 1993. Cleavage of cellubrevin by tetanus toxin does not affect fusion of early endosomes. *J. Biol. Chem.* 268:18423-18426.
87. Liou, W., H.J.Geuze, M.J.Geelen, and J.W.Slot. 1997. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 136:61-70.

88. Liu, Y., Y.Sugiura, and W.Lin. 2011. The role of synaptobrevin1/VAMP1 in  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J. Physiol* 589:1603-1618.
89. Lu, X., F.Zhang, J.A.McNew, and Y.K.Shin. 2005. Membrane fusion induced by neuronal SNAREs transits through hemifusion. *J. Biol. Chem.* 280:30538-30541.
90. Luzio, J.P., M.D.Parkinson, S.R.Gray, and N.A.Bright. 2009. The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochem. Soc. Trans.* 37:1019-1021.
91. Luzio, J.P., B.A.Rous, N.A.Bright, P.R.Pryor, B.M.Mullock, and R.C.Piper. 2000. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 9):1515-1524.
92. Malsam, J., S.Kreye, and T.H.Sollner. 2008. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol. Life Sci.* 65:2814-2832.
93. Mandic, R. and A.W.Lowe. 1999. Characterization of an alternatively spliced isoform of rat vesicle associated membrane protein-2 (VAMP-2). *FEBS Lett.* 451:209-213.
94. Mandic, R., W.S.Trimble, and A.W.Lowe. 1997. Tissue-specific alternative RNA splicing of rat vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1). *Gene* 199:173-179.

95. Martinez-Arca, S., R.Rudge, M.Vacca, G.Raposo, J.Camonis, V.Proux-Gillardeaux, L.Daviet, E.Formstecher, A.Hamburger, F.Filippini, M.D'Esposito, and T.Galli. 2003. A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:9011-9016.
96. Matz, M.V., A.F.Fradkov, Y.A.Labas, A.P.Savitsky, A.G.Zaraisky, M.L.Markelov, and S.A.Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17:969-973.
97. Maycox, P.R., E.Link, A.Reetz, S.A.Morris, and R.Jahn. 1992. Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* 118:1379-1388.
98. Mayer, A., W.Wickner, and A.Haas. 1996. Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* 85:83-94.
99. McCaffery, C.A. and L.J.DeGennaro. 1986. Determination and analysis of the primary structure of the nerve terminal specific phosphoprotein, synapsin I. *EMBO J.* 5:3167-3173.
100. McNew, J.A., T.Weber, D.M.Engelman, T.H.Sollner, and J.E.Rothman. 1999. The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. *Mol. Cell* 4:415-421.
101. McNew, J.A., T.Weber, F.Parlati, R.J.Johnston, T.J.Melia, T.H.Sollner, and J.E.Rothman. 2000. Close is not enough: SNARE-dependent membrane

- fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *J. Cell Biol.* 150:105-117.
102. Melia, T.J., T.Weber, J.A.McNew, L.E.Fisher, R.J.Johnston, F.Parlati, L.K.Mahal, T.H.Sollner, and J.E.Rothman. 2002. Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins. *J. Cell Biol.* 158:929-940.
103. Meng, J., J.Wang, G.Lawrence, and J.O.Dolly. 2007. Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential. *J. Cell Sci.* 120:2864-2874.
104. Monosov, E.Z., T.J.Wenzel, G.H.Luers, J.A.Heyman, and S.Subramani. 1996. Labeling of peroxisomes with green fluorescent protein in living *P. pastoris* cells. *J. Histochem. Cytochem.* 44:581-589.
105. Moreira, R.F. and C.J.Noren. 1995. Minimum duplex requirements for restriction enzyme cleavage near the termini of linear DNA fragments. *Biotechniques* 19:56, 58-56, 59.
106. Mullen, R.T. and R.N.Trelease. 2000. The sorting signals for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase are within its C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* 275:16337-16344.

107. Nemoto, Y. and C.P.De. 1999. Recruitment of an alternatively spliced form of synaptobrevin 2 to mitochondria by the interaction with the PDZ domain of a mitochondrial outer membrane protein. *EMBO J.* 18:2991-3006.
108. Ngatchou, A.N., K.Kisler, Q.Fang, A.M.Walter, Y.Zhao, D.Bruns, J.B.Sorensen, and M.Lindau. 2010. Role of the synaptobrevin C terminus in fusion pore formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107:18463-18468.
109. Nguyen, M., D.G.Millar, V.W.Yong, S.J.Korsmeyer, and G.C.Shore. 1993. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 268:25265-25268.
110. Nilsen, T.W. and B.R.Graveley. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463:457-463.
111. Nystuen, A.M., J.K.Schwendinger, A.J.Sachs, A.W.Yang, and N.B.Haider. 2007. A null mutation in VAMP1/synaptobrevin is associated with neurological defects and prewean mortality in the lethal-wasting mouse mutant. *Neurogenetics.* 8:1-10.
112. Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:867.
113. Papini, E., O.Rossetto, and D.F.Cutler. 1995. Vesicle-associated membrane protein (VAMP)/synaptobrevin-2 is associated with dense core secretory granules in PC12 neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 270:1332-1336.



114. Parlati, F., J.A.McNew, R.Fukuda, R.Miller, T.H.Sollner, and J.E.Rothman. 2000. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* 407:194-198.
115. Pobbati, A.V., A.Stein, and D.Fasshauer. 2006. N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. *Science* 313:673-676.
116. Protopopov, V., B.Govindan, P.Novick, and J.E.Gerst. 1993. Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* 74:855-861.
117. Pryor, P.R., B.M.Mullock, N.A.Bright, M.R.Lindsay, S.R.Gray, S.C.Richardson, A.Stewart, D.E.James, R.C.Piper, and J.P.Luzio. 2004. Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep.* 5:590-595.
118. Pyle, J.L., E.T.Kavalali, E.S.Piedras-Renteria, and R.W.Tsien. 2000. Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 28:221-231.
119. Quinones, B., K.Riento, V.M.Olkkonen, S.Hardy, and M.K.Bennett. 1999. Syntaxin 2 splice variants exhibit differential expression patterns, biochemical properties and subcellular localizations. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 23):4291-4304.
120. Raingo, J., M.Khvotchev, P.Liu, F.Darios, Y.C.Li, D.M.Ramirez, M.Adachi, P.Lemieux, K.Toth, B.Davletov, and E.T.Kavalali. 2012. VAMP4 directs

- synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat. Neurosci.* 15:738-745.
121. Reese, C., F.Heise, and A.Mayer. 2005. Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion. *Nature* 436:410-414.
122. Regnier-Vigouroux, A. and W.B.Huttner. 1993. Biogenesis of small synaptic vesicles and synaptic-like microvesicles. *Neurochem. Res.* 18:59-64.
123. Rice, L.M. and A.T.Brunger. 1999. Crystal structure of the vesicular transport protein Sec17: implications for SNAP function in SNARE complex disassembly. *Mol. Cell* 4:85-95.
124. Rossetto, O., L.Gorza, G.Schiavo, N.Schiavo, R.H.Scheller, and C.Montecucco. 1996. VAMP/synaptobrevin isoforms 1 and 2 are widely and differentially expressed in nonneuronal tissues. *J. Cell Biol.* 132:167-179.
125. Royle, S.J. and L.Lagnado. 2003. Endocytosis at the synaptic terminal. *J. Physiol* 553:345-355.
126. Salaun, C., D.J.James, J.Greaves, and L.H.Chamberlain. 2004. Plasma membrane targeting of exocytic SNARE proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1693:81-89.

127. Salem, N., V.Faundez, J.T.Horng, and R.B.Kelly. 1998. A v-SNARE participates in synaptic vesicle formation mediated by the AP3 adaptor complex. *Nat. Neurosci.* 1:551-556.
128. Sara, Y., M.G.Mozhayeva, X.Liu, and E.T.Kavalali. 2002. Fast vesicle recycling supports neurotransmission during sustained stimulation at hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 22:1608-1617.
129. Scherer, W.F., J.T.Syverton, and G.O.Gey. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 97:695-710.
130. Scheuber, A., R.Rudge, L.Danglot, G.Raposo, T.Binz, J.C.Poncer, and T.Galli. 2006. Loss of AP-3 function affects spontaneous and evoked release at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:16562-16567.
131. Schiavo, G., F.Benfenati, B.Poulain, O.Rossetto, L.P.Polverino de, B.R.Dasgupta, and C.Montecucco. 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359:832-835.
132. Schiavo, G., O.Rossetto, S.Catsicas, L.P.Polverino de, B.R.Dasgupta, F.Benfenati, and C.Montecucco. 1993. Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J. Biol. Chem.* 268:23784-23787.

133. Seglen, P.O. and P.Bohley. 1992. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48:158-172.
134. Shimomura, O., F.H.Johnson, and Y.Saiga. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp Physiol* 59:223-239.
135. Simonsen, A., B.Bremnes, E.Ronning, R.Aasland, and H.Stenmark. 1998. Syntaxin-16, a putative Golgi t-SNARE. *Eur. J. Cell Biol.* 75:223-231.
136. Smith, S.M., R.Renden, and G.H.von. 2008. Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval. *Trends Neurosci.* 31:559-568.
137. Sokolov, B.P., A.A.Tcherepanov, V.Haroutunian, and K.L.Davis. 2000. Levels of mRNAs encoding synaptic vesicle and synaptic plasma membrane proteins in the temporal cortex of elderly schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry* 48:184-196.
138. Sollner, T., M.K.Bennett, S.W.Whiteheart, R.H.Scheller, and J.E.Rothman. 1993a. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409-418.
139. Sollner, T., S.W.Whiteheart, M.Brunner, H.Erdjument-Bromage, S.Geromanos, P.Tempst, and J.E.Rothman. 1993b. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318-324.

140. Sollner, T.H. 2004. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:429-435.
141. Stenovec, M., P.P.Goncalves, and R.Zorec. 2013. Peptide hormone release monitored from single vesicles in "membrane lawns" of differentiated male pituitary cells: SNAREs and fusion pore widening. *Endocrinology* 154:1235-1246.
142. Subramani, S. 1998. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev.* 78:171-188.
143. Sudhof, T.C., M.Baumert, M.S.Perin, and R.Jahn. 1989. A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to Drosophila. *Neuron* 2:1475-1481.
144. Sudhof, T.C., F.Lottspeich, P.Greengard, E.Mehl, and R.Jahn. 1987. A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science* 238:1142-1144.
145. Sze, C.I., H.Bi, B.K.Kleinschmidt-DeMasters, C.M.Filley, and L.J.Martin. 2000. Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains. *J. Neurol. Sci.* 175:81-90.
146. Takamori, S., M.Holt, K.Stenius, E.A.Lemke, M.Gronborg, D.Riedel, H.Urlaub, S.Schenck, B.Brugger, P.Ringler, S.A.Muller, B.Rammner, F.Grater, J.S.Hub, B.L.De Groot, G.Mieskes, Y.Moriyama, J.Klingauf, H.Grubmuller, J.Heuser,

- F.Wieland, and R.Jahn. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831-846.
147. Takuma, T., T.Arakawa, M.Okayama, I.Mizoguchi, A.Tanimura, and Y.Tajima. 2002. Trafficking of green fluorescent protein-tagged SNARE proteins in HSY cells. *J. Biochem.* 132:729-735.
148. Taubenblatt, P., J.C.Dedieu, T.Gulik-Krzywicki, and N.Morel. 1999. VAMP (synaptobrevin) is present in the plasma membrane of nerve terminals. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 20):3559-3567.
149. Tooze, J., M.Hollinshead, T.Ludwig, K.Howell, B.Hoflack, and H.Kern. 1990. In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J. Cell Biol.* 111:329-345.
150. Towbin, H., T.Staehelin, and J.Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76:4350-4354.
151. Traub, L.M. 2009. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:583-596.
152. Trimble, W.S. 1993. Analysis of the structure and expression of the VAMP family of synaptic vesicle proteins. *J. Physiol Paris* 87:107-115.

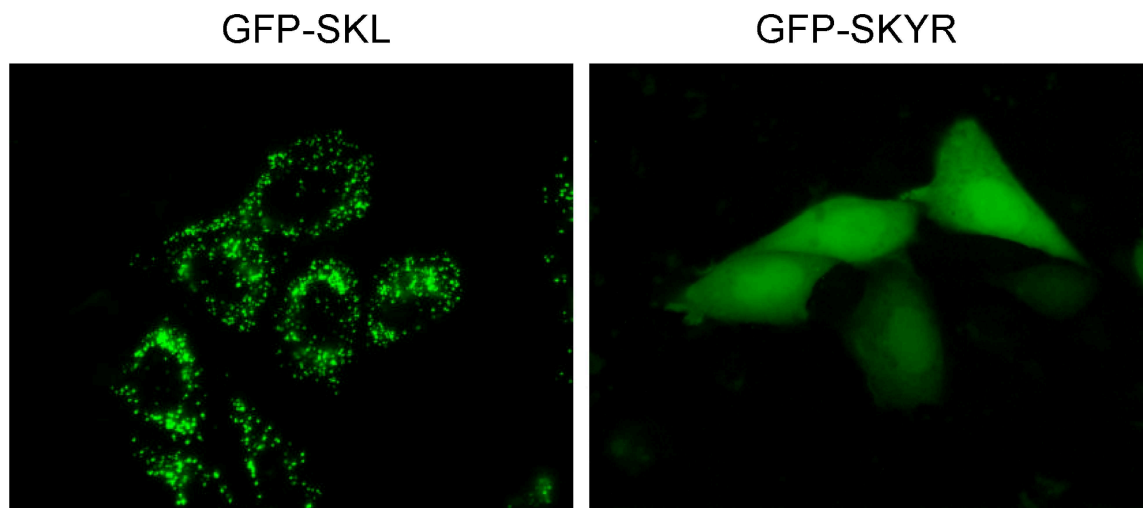
153. Trimble, W.S., D.M.Cowan, and R.H.Scheller. 1988. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:4538-4542.
154. Trimble, W.S., T.S.Gray, L.A.Elferink, M.C.Wilson, and R.H.Scheller. 1990. Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain. *J. Neurosci.* 10:1380-1387.
155. Trowbridge, I.S., J.F.Collawn, and C.R.Hopkins. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:129-161.
156. Vardjan, N., M.Stenovec, J.Jorgacevski, M.Kreft, and R.Zorec. 2007. Subnanometer fusion pores in spontaneous exocytosis of peptidergic vesicles. *J. Neurosci.* 27:4737-4746.
157. Voglmaier, S.M. and R.H.Edwards. 2007. Do different endocytic pathways make different synaptic vesicles? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17:374-380.
158. Voglmaier, S.M., K.Kam, H.Yang, D.L.Fortin, Z.Hua, R.A.Nicoll, and R.H.Edwards. 2006. Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron* 51:71-84.
159. von Poser, C., J.Z.Zhang, C.Mineo, W.Ding, Y.Ying, T.C.Sudhof, and R.G.Anderson. 2000. Synaptotagmin regulation of coated pit assembly. *J. Biol. Chem.* 275:30916-30924.

160. Wang, Y., I.Dulubova, J.Rizo, and T.C.Sudhof. 2001. Functional analysis of conserved structural elements in yeast syntaxin Vam3p. *J. Biol. Chem.* 276:28598-28605.
161. Watson, R.T. and J.E.Pessin. 2001. Transmembrane domain length determines intracellular membrane compartment localization of syntaxins 3, 4, and 5. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281:C215-C223.
162. Wienisch, M. and J.Klingauf. 2006. Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. *Nat. Neurosci.* 9:1019-1027.
163. Wong, S.H., T.Zhang, Y.Xu, V.N.Subramaniam, G.Griffiths, and W.Hong. 1998. Endobrevin, a novel synaptobrevin/VAMP-like protein preferentially associated with the early endosome. *Mol. Biol. Cell* 9:1549-1563.
164. Xu, Y., F.Zhang, Z.Su, J.A.McNew, and Y.K.Shin. 2005. Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:417-422.
165. Yassine, W., A.Milochau, S.Buchoux, J.Lang, B.Desbat, and R.Oda. 2010. Effect of monolayer lipid charges on the structure and orientation of protein VAMP1 at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 1798:928-937.
166. Zwilling, D., A.Cypionka, W.H.Pohl, D.Fasshauer, P.J.Walla, M.C.Wahl, and R.Jahn. 2007. Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies. *EMBO J.* 26:9-18.



## 8. Anhang

### 8.1 Ergänzende Abbildung



**Abbildung 8.1 Die C-terminale Sequenz -SKYR führt nicht zu einer peroxisomalen Sortierung von GFP.** Das einfache Anhängen der PTS1 (*peroxisomal targeting signal 1*) Sequenz –SKL an den C-Terminus des GFP Proteins sortiert GFP zu Peroxisomen (typisches punktiertes Muster) in CHO (*Chinese hamster ovary*) Zellen. Im Gegensatz hierzu bewirkt das Anfügen der VAMP-1b-spezifischen C-terminalen Sequenz –SKYR keine peroxisomale Sortierung, es zeigt sich eine zytosolische Verteilung des Proteins. (Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Georg H. Lüers, AG Seitz, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps Universität Marburg; aktuelle Adresse Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

a.d.	aqua destillata
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	<i>base pairs</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGRP	<i>calcitonin gene related peptide</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	Diamidin-Phenylindol-Dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EEA1	<i>early endosomal antigen 1</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evtl.	eventuell
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
i.d.R.	in der Regel
LB	Luria Bertani
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
m	milli bzw. Meter
M	molar
MAP LC3beta	<i>microtubule-associated protein light chain 3beta</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	<i>minute</i>
MW	<i>molecular weight</i>
μ	mikro
n	nano
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NP40	Nonidet-P40
NSF	<i>N-ethylmaleimide sensitive factor</i>

nt	Nukleotid
p	piko
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	potentia hydrogenii
PTS1	<i>peroxisomal targeting signal 1</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rpm	<i>rounds per minute</i>
S	<i>Svedberg unit</i>
S.cerevisiae	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	<i>sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide-gelelektrophoresis</i>
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>SNAP-receptor</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
t-SNARE	<i>target-SNARE</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VAMP	<i>vesicle associated membrane protein</i>
v-SNARE	<i>vesicle-SNARE</i>
v/v	Volumenprozent
WB	<i>Western blot</i>
z.B.	zum Beispiel

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1</b> Transportwege der Zelle und beteiligte Kompartimente des Endomembransystems, modifiziert nach Bonifacino und Glick (Bonifacino and Glick, 2004).....	2
<b>Abbildung 1.2</b> Ablauf des SNARE-Zyklus, modifiziert nach Jahn und Scheller (Jahn and Scheller, 2006).....	4
<b>Abbildung 1.3</b> Hemifusion von Vesikel und Plasmamembran, modifiziert nach Jahn und Scheller (Jahn and Scheller, 2006).....	5
<b>Abbildung 1.4</b> Schema zum Aufbau von VAMP (Synaptobrevin) aus drei verschiedenen funktionellen Domänen, modifiziert nach Trimble und Kollegen (Trimble et al., 1988).....	7
<b>Abbildung 1.5</b> Alternatives Spleißen mit Intronretention in VAMP-1, modifiziert nach Mandic und Kollegen (Mandic et al., 1997).....	11
<b>Abbildung 2.1</b> Generierung von GFP- bzw. RFP-VAMP-1a und -1b Konstrukten....	28
<b>Abbildung 2.2</b> Generierung von VAMP-1a und VAMP-1b Amplikons für die Subklonierung in GFP- und RFP-Vektoren.....	31
<b>Abbildung 2.3</b> Agarosegel nach Doppelverdau von 17 µl isolierter DNA (Mini-Prep) mit EcoRI und HindIII.....	36
<b>Abbildung 2.4</b> Schema TIRF-Mikroskopie, modifiziert nach Groves und Kollegen (Groves et al., 2008).....	41
<b>Abbildung 2.5</b> Proteinstandardkurve.....	43
<b>Abbildung 3.1</b> Expression der GFP- und RFP-VAMP-1a und -1b Konstrukte.....	48
<b>Abbildung 3.2</b> Einzelexpression der GFP- und RFP-VAMP-1 Fusionsproteine.....	49
<b>Abbildung 3.3</b> Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1a in HeLa-Zellen.....	51
<b>Abbildung 3.4</b> Kotransfektion von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1b in HeLa-Zellen.....	52
<b>Abbildung 3.5</b> Kotransfektion von GFP-VAMP-1a und RFP-VAMP-1b in HeLa-Zellen.....	54
<b>Abbildung 3.6</b> Kotransfektion von GFP-VAMP-1b und RFP-VAMP-1a in HeLa-Zellen.....	55
<b>Abbildung 3.7</b> Darstellung von RFP- und GFP-positiven Vesikeln mittels TIRF-Mikroskopie.....	59

<b>Abbildung 3.8</b> Hinweise auf Vesikelkontakt ohne Fusion.....	60
<b>Abbildung 3.9</b> Hinweise auf Fusion GFP-VAMP-1a- und RFP-VAMP-1b-exprimierender Vesikel.....	61
<b>Abbildung 3.10</b> VAMP-1a sortiert nicht zu Mitochondrien.....	63
<b>Abbildung 3.11</b> VAMP-1b sortiert nicht zu Mitochondrien.....	64
<b>Abbildung 3.12</b> VAMP-1a sortiert nicht zu Peroxisomen.....	65
<b>Abbildung 3.13</b> VAMP-1b sortiert nicht zu Peroxisomen.....	66
<b>Abbildung 3.14</b> Untersuchungen zur möglichen Kolokalisation von GFP-VAMP-1a mit frühen Endosomen.....	68
<b>Abbildung 3.15</b> Untersuchungen zur möglichen Kolokalisation von GFP-VAMP-1b mit frühen Endosomen.....	69
<b>Abbildung 3.16</b> Untersuchungen zur möglichen Kolokalisation von GFP-VAMP-1a mit Lysosomen.....	70
<b>Abbildung 3.17</b> Untersuchungen zur möglichen Kolokalisation von GFP-VAMP-1b mit Lysosomen.....	71
<b>Abbildung 3.18</b> Kolokalisation von GFP-VAMP-1a mit Autophagosomen.....	73
<b>Abbildung 3.19</b> Kolokalisation von GFP-VAMP-1b mit Autophagosomen.....	74
<b>Abbildung 4.1</b> Zusammenfassendes Modell zur subzellulären Sortierung der VAMP-1a und -1b Isoformen.....	87
<b>Abbildung 8.1</b> Die C-terminale Sequenz -SKYR führt nicht zu einer peroxisomalen Sortierung von GFP.....	117

#### **8.4 Tabellarischer Lebenslauf**

Die Seite 122 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## **8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

### **Meine akademischen Lehrer waren die Damen bzw. Herren**

Arnold, Aumüller, Bals, Barth, Basler, Baum, Baumann, Berger, Bette, Bien, Boeckhoff, Büch, Bürk, Cetin, Daut, del Rey, Donner-Banzhoff, Dünne, Duda, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Gemsa, Geus, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Hamer, Happle, Hasilik, Herrmann-Lingen, Hertl, Höffken, Höglinger, Hörle, Jacques, Jungclas, Kalinowski, Kann, Käuser, Kern, Kill, Klenk, Klose, Koehler, König, Koolmann, Kroll, Kühnert, Kuhlmann, Lill, Liss, Lohoff, Löffler, Lüers, Maier, Maisch, Mandic, Mandrek, Mennel, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nittel, Oertel, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer J, Schäfer M, Schofer, Schu, Seitz, Sesterhenn, Steiniger, Stief, Sundermeyer, Suske, Teymoortash, von Bassewitz, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Ziring.

## 8.6 Danksagung

Für die Möglichkeit, dass ich diese Doktorarbeit im Medizinischen Zentrum für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Marburg durchführen konnte, möchte ich Herrn Prof. Dr. Jochen A. Werner herzlich danken.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt dem Leiter des HNO-Forschungslabors Prof. Dr. Robert Mandic und Frau Prof. Dr. Susanne Wiegand, die mit ihrer Unterstützung und Betreuung diese Doktorarbeit möglich machten. Prof. Mandic verdanke ich nur die besten Erfahrungen mit der Laborarbeit und ich danke ihm sehr für fachlichen Sachverstand und die Zeit, die er für eine gute Betreuung investierte. Seine Begeisterung für die Forschung war jederzeit spürbar und er motivierte mich für das Projekt, das ohne seine Hilfe nicht verwirklicht worden wäre.

Frau Roswitha Peldszus und Frau Grazyna Sadowski gilt ebenfalls mein herzlicher Dank. Sie haben als MTAs im Labor beim experimentellen Teil der Doktorarbeit stets mit Rat und Tat beigestanden und bescherten mir erfahrungsreiche und lustige Stunden.

Weiterhin danke ich ganz herzlich Herrn PD Dr. Michael Bette (AG Weihe, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg), der nicht nur durch seine fachkundige Mithilfe und zeitintensive Anleitung am Mikroskop wesentlich zum erfolgreichen Abschluss des Projekts beigetragen hat, sondern auch moralisch und einfach freundschaftlich zur Seite stand. PD Dr. Gabriel Bonaterra (AG Kinscherf, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg) möchte ich danken für die Möglichkeit der Nutzung des Mikroskops und die geduldige Anleitung und freundliche Unterstützung beim Mikroskopieren, sowie Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer (Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps Universität Marburg, Direktor: Prof. Dr. Roland Lill) für seine Unterstützung.

Meinen Mit-Doktorandinnen Vanessa Krohn, Branka Dakic und Carolina Sterz möchte ich für die Anleitung bei PCR, Western Blot und 2D-Gelelektrophorese danken. Zusammen mit ihnen, Galina Makarova und Chengzhong Cai war es stets eine nette Zusammenarbeit und gute Stimmung im Labor.



Herrn Prof. Dr. Ralf Jacob und Frau Dr. Sophie Veitinger (Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps Universität Marburg, Direktor: Prof. Dr. Roland Lill) danke ich für die Nutzungsmöglichkeit des TIRF-Mikroskops und die Betreuung bei der Durchführung der Experimente, weiterhin für die zur Verfügungstellung von Reagenzien.

Herrn Prof. Dr. Georg H. Lüers (AG Seitz, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps Universität Marburg; aktuelle Adresse Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) danke ich dafür, dass er das GFP-SKL Konstrukt zur Verfügung stellte, und Herrn Prof. Dr. William Trimble (Department of Biochemistry, University of Toronto, Canada) für die Überlassung des VAMP-1 Vektors.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, der ganzen Familie und meinen Jogis bedanken, die stets interessiert am Fortschritt der Arbeit waren und mich bei all meinen Vorhaben von Anfang bis zuletzt unterstützten. Ohne sie wäre ich nicht, wo ich bin.

## **8.7 Ehrenwörtliche Erklärung**

Die Seite 126 (Ehrenwörtliche Erklärung) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.